

ÜBER DEN NACHWEIS
EINES LYMPHOZYTEN-MEDIATORS
BEIM SCHWEIN IM GRANULOZYTEN-
MIGRATIONSCHEMMUNGS-TEST

Ursula Sallinger

Diss München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0042

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr)
und dem Institut für
Blutgruppen- und Resistenzforschung der Tierzuchtforschung e.V. München
(Wissenschaftlicher Leiter: Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr)
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. O. Schmid

ÜBER DEN NACHWEIS EINES LYMPHOZYTEN-MEDIATORS
BEIM SCHWEIN
IM GRANULOZYTEN - MIGRATIONSHemmungs - TEST

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Ursula Sallinger
aus Rastatt

München 1984

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. EINLEITUNG	2
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Zelluläre Immunität	3
2.2. Mediatoren der zellulären Immunität	4
Lymphokinbildung nach Stimulierung durch Antigene	5
Lymphokinbildung nach Stimulierung durch Mitogene	6
2.3. Die Mitogene Concanavalin A und Phytohämagglutinin und ihre Wirkung	8
2.4. Testverfahren zum Nachweis von Lymphokinen Der Migrationshemmungstest	10
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
3.1. Material	14
3.1.1. Versuchstiere	14
3.1.2. Blutentnahme	15
3.1.3. Herstellung der im Test verwendeten Medien und Agarosepräparationen	16
3.2. Methode	19
3.2.1. Direkter Granulozyten-Migrationstest	19
3.2.2. Durchführung des Granulozyten-Migrationstests	22
3.2.2.1 Isolierung der Granulozyten im Dichtegradientenverfahren	22
3.2.2.2. Isolierung der Lymphozyten im Dichtegradientenverfahren	23
3.2.2.3. Zellzählung	24
3.2.2.4. Präparation der Testplatten	26
3.2.2.5. Einpipettieren der Zellen in die Testplatten	26
3.2.3. Auswertung	28
3.2.4. Lymphozytentypisierung	30
4. ERGEBNISSE	32
4.1. Methode	32
4.1.1. Anwendungsmöglichkeiten des kombinierten Testverfahrens	35

4.2.	Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	37
4.2.1.	Granulozytenmigration nach Stimulierung autologer Lymphozyten durch die Mitogene ConA und PHA	37
4.2.2.	Vergleich der Stimulierbarkeit der Lymphozyten eines Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten	54
4.2.3.	Häufigkeitsverteilung der Migrationshemmungsindices	59
5.	DISKUSSION	71
6.	ZUSAMMENFASSUNG	78
7.	SUMMARY	80
8.	LITERATURVERZEICHNIS	82

1. EINLEITUNG

Das zelluläre Immunsystem in seiner Bedeutung für die Auseinandersetzung des menschlichen und tierischen Organismus mit seiner Umwelt, wurde in den letzten Jahren zum Gegenstand vieler experimenteller Arbeiten.

Die Aufklärung der Regelmechanismen und Interaktionen zwischen den Effektorzellen des zellulären und humoralen Immunsystems wurde durch die Entdeckung löslicher Leukozyten-Mediatoren, die den Kontakt zwischen den verschiedenen Immunzellen herstellen und ihre Funktionen koordinieren und steuern, eingeleitet. (WAKSMAN und NAMBA (1976). Zu den Zellen, die Mediatoren freisetzen, gehören Makrophagen und T-Lymphozyten, die für die Erkennung körperfremder Substanzen verantwortlich sind. Diese Immunzellen unterliegen der genetischen Kontrolle des Histokompatibilitäts-Komplex. Für die von Lymphozyten gebildeten Mediatoren wurde von DUMONDE et al. (1969) die Bezeichnung Lymphokine eingeführt.

Der Migrationshemmungsfaktor, der nach Stimulation von Lymphozyten durch Antigene und Mitogene gebildet wird, gehört zu diesen Lymphokinen.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zunächst die Ausarbeitung einer Methode zum Nachweis dieses Migrationshemmungsfaktors im autologen System beim Schwein. Es sollte untersucht werden, ob der verwendete Migrations-Hemmungs-Test zur Prüfung der Funktion des zellulären Immunsystems herangezogen werden kann.



2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Zelluläre Immunität

Das Immunsystem des Menschen und der höher entwickelten Tiere besteht aus zwei miteinander verbundenen Systemen, der zellulären und der humoralen Immunität.

Makrophagen und T-Lymphozyten bilden die Effektorzellen der zellulären Immunität. Aus der gleichen Stamm-Zelllinie des Knochenmarks stammen die B-Lymphozyten, die Träger der humoralen Immunität. Durch Differenzierung während der Reifungsphase des Immunsystems werden die einzelnen funktionellen Zell-Linien mit spezifischen Aufgabenbereichen gebildet. Sie stehen untereinander in engem Kontakt. Eine Kooperation und gegenseitige Beeinflussung der Zellen werden bei Stimulierung der Zellen mit Antigenen durch die Bildung löslicher Mediatoren und andere Interaktionen vermittelt. Die Mediatoren, Lymphokine und Interleukine, werden von T-Lymphozyten bzw. Makrophagen in einer genetisch durch den Major-Histocompatibility-Complex (MHC) determinierten Reaktionskette gebildet. (BERTRAMS und RITTNER (1981). T-Lymphozyten und ihre Subpopulationen, Helfer- und Suppressorzellen, können mit diesen Mediatorstoffen stimulierend und hemmend auf die Zellen des humoralen Systems, die B-Lymphozyten, einwirken. Die Informationsübertragung zwischen den beiden Systemen bewirkt eine Differenzierung der B-Lymphozyten in Plasmazellen, die dann spezifisch gegen das jeweilige Antigen gerichtete Antikörper produzieren.

Auch innerhalb des zellulären Systems gibt es Regelkreise. T-Lymphozyten werden durch Makrophagenprodukte zur Proliferation und zur Ausdifferenzierung zu zytotoxischen und Memory-Zellen befähigt. Auch die

Subpopulationen der T-Lymphozyten beeinflussen sich gegenseitig.(WECKER und SCHIMPL (1979).

Das komplizierte Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen wird beim Menschen durch Gene der DR-Region des MHC gesteuert.(BERTRAMS und RITTNER (1981).

2.2. Mediatoren der zellulären Immunität

Lymphokine sind lösliche Mediatoren, die von immunkompetenten Lymphozytenpopulationen nach Stimulation mit Antigenen, Mitogenen (PICK und TURK (1972), ROCKLIN (1974) und in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) (CLAUSEN (1972), LOHRMANN et al.(1974) gebildet werden. WAKSMAN und NAMBA (1976) berichten über eine Vielzahl verschiedener Mediatoren, die regulierend und steuernd auf andere Zellen des Immunsystems einwirken. Neben Lymphokinen aus Lymphozyten, werden auch Monokine aus Monozyten bzw. Makrophagen und Cytokine, die von anderen Zellen gebildet werden, beschrieben. PICK und TURK (1972) befassen sich mit der Charakterisierung und Funktion von Lymphokinen.

Als Bildungszellen der Lymphokine werden T-Lymphozyten angesehen. (BENNETT und BLOOM (1967). YOSHIDA und COHEN (1974) fanden jedoch beim Meerschweinchen auch bei B-Lymphozyten eine Lymphokinaktivität nach Stimulierung mit PPD (Purified-Protein-Derivative) und LPS (Lipopolysaccharide) selbst bei nicht sensibilisierten Tieren.

AVRILOMMI und RÄSÄNEN (1975) beschrieben eine spontane Freisetzung von Lymphokinen durch menschliche Lymphozyten ohne Antigen- oder Mitogenstimulierung. Nach Fraktionierung der Lymphozytenpräparation durch

Rosettierung mit Schaferythrozyten konnten B-Lymphozyten und/oder Monozyten als Zellen der Lymphokinbildung identifiziert werden.

Mit der Wirkung von Mediatoren auf die anderen Zellen des Immunsystems befaßten sich NATHAN et al.(1971), NATH et al.(1973), ROCKLIN (1978), WECKER und SCHIMPL (1979).

Lymphokinbildung nach Antigenstimulierung

Der erste bekannte Lymphozytenfaktor war der Migrationshemmungsfaktor MIF (Migration-Inhibiting-Factor). DUMONDE et al.(1969) bezeichneten diese, von sensibilisierten Lymphozyten nach Stimulierung mit dem entsprechenden Antigen gebildete, lösliche Substanz, als Lymphokin.

Dieser Migrationshemmungsfaktor wurde auch von DAVID et al.(1964) und BLOOM und BENNETT (1966) als Produkt sensibilisierter Lymphozyten erkannt. Er trat erstmalig 4 - 6 Stunden nach Antigenstimulierung auf und konnte bei Abwesenheit des Antigens vier Tage lang nachgewiesen werden.(BENNETT und BLOOM (1967), PICK et al.(1970).

ROCKLIN (1974) differenzierte mit Hilfe physikochemischer Methoden zwei Migrationshemmungsfaktoren, MIF für die Migrationshemmung menschlicher Monozyten und Meerschweinchenmakrophagen, und LIF (Leucocyte-Migration-Inhibiting-Factor), der die Migration humaner polymorphkerniger Leukozyten hemmt. Er konnte den Nachweis erbringen, daß sensibilisierte Donoren bei Stimulierung durch das spezifische Antigen beide Faktoren freisetzen. HOFFMAN et al.(1977) wiesen auch beim Meerschweinchen gleichzeitig MIF und LIF nach.

Den antigen-spezifisch freigesetzten Leukozyten-Migrationshemmungsfaktor LIF untersuchten BERTOTTO et al.(1981) beim Menschen, BERGMAN (1980) beim Schwein und TIMMS (1980) beim Huhn.

Die Beziehung zwischen der MIF - Freisetzung nach Antigenstimulierung und der Bildung weiterer Lymphokine, der Interferone, untersuchten SALVIN et al.(1973), NETA (1981), NETA et al.(1981 a,b,1982) mit Inzuchtmäusestämmen.

Einen Überblick über alle, die Migration von Zellen beeinflussenden Faktoren , gibt BERGSTRAND (1979).

Lymphokinbildung nach Mitogenstimulierung

Die Freisetzung von Lymphokinen nach unspezifischer Stimulierung mit pflanzlichen Mitogenen und bakteriellen Substanzen wurde von PICK et al. (1970) untersucht. ROCKLIN (1975) fand nach Stimulierung menschlicher Lymphozyten einen Leukozyten-Migrationshemmungs-Faktor, der mit dem, von antigenstimulierten sensibilisierten Lymphozyten gebildeten LIF (ROCKLIN (1974) identisch war.

Pflanzenlektine, vor allem Concanavalin A (ConA), ein Extrakt aus *Canavalia ensiformis*, wurden zur Untersuchung von Interaktionen zwischen den immunkompetenten Zellen, beispielsweise der Kooperation zwischen Makrophagen und Lymphozyten (SALVIN et al.(1973), WAKSMAN und NAMBA (1976), KUMAR et al.(1979), KALLENBERG et al.(1980), OTZ et al.(1980), und zum Nachweis von Lymphozyten-Subpopulationen mit Suppressor- und Helferfunktion verwendet.(DUTTON u. HUNTER (1974), MUSCOPLAT et al. (1977), HERSCOWITZ et al.(1980), KALLENBERG et al.(1980), SMITH et al.(1981), GATTRINGER und HUBER (1983), DAMLE und GUPTA (1982), BRANDO et al.(1983).

Durch die polyklonale Stimulierung mit Mitogenen wird ein großer Prozentsatz von Lymphozyten in Lymphoblasten transformiert. Während dieser

Transformation kommt es zur Bildung von Lymphokinen, zur Proliferation und Differenzierung. Die Proliferationsrate kann durch Messung des Anstiegs im Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Gehalt in der Synthesephase des Zellzyklus mit Hilfe radioaktiv markierter Nukleotide untersucht werden. Einen Gesamtüberblick über diesen sogenannten Lymphozytenstimulationstest geben KRISTENSEN et al.(1982).

Die Phase der Lymphokinproduktion, Phase G_1 (KRISTENSEN et al.(1982), geht der Proliferationsphase voraus.(PICK und TURK (1972). Zum weiteren Ablauf des Zellzyklus von G_{1b} nach S sind zusätzliche Aktivatoren notwendig. GILLIS et al.(1980) stellten bei Mensch, Ratte und Maus fest, daß es sich dabei um Interleukin-2 (IL-2), früher T-Cell-Growth-Factor (TCGF) bezeichnet, handelt. SMITH et al. (1980) erweiterten diese Befunde durch den Nachweis, daß zur IL-2 Produktion ein weiteres Interleukin, IL-1, früher LAF (Lymphocyte-Activating-Factor)(WAKSMAN und NAMBA (1976), das von Makrophagen gebildet wird, notwendig ist.

Die Rezeptoren für IL-2 an menschlichen T-Lymphozyten sind bekannt. (KIPP und ASKONAS (1982).

PALACIOS (1982) stellte mit Hilfe monoklonaler Antikörper fest, daß die gleichen Zellen, die IL-2 freisetzen, Helferfunktion für die Produktion von IL-1 durch Makrophagen besitzen. Diese Funktion scheint durch direkten Zellkontakt zustande zu kommen, ohne Beteiligung eines löslichen Faktors.

Die Produktion und der regelgerechte Ablauf der Kooperation zwischen den einzelnen Faktoren kann durch exogene Einflüsse und Substanzen gestört werden. SLOMAN und BELL (1980) führen die Unterdrückung einer Lymphozytenproliferation als Antwort auf Mitogene, durch Steroidhormone und Colchicin auf die Blockierung der IL-2 Bildung zurück.

Die Frage der genetischen Determinierung der Immunantwort wurde an Ratten, von NEWLIN und GASSER (1973), an Mäusen, von WILLIAMS und BENACERRAF (1974), Rindern, von BUSCHMANN et al. (1980), und Schweinen, von JENSEN und CHRISTENSEN (1981 b), untersucht.

Den Einfluß genetisch determinierter Lymphozytenantigene auf die Produktion von Mediatoren untersuchten BERTRAMS und RITTNER (1981) und PALACIOS (1982). CARUSO und BELLINA (1983) fanden bei Merkmalsträgern für bestimmte Lymphozytenantigene in Histokompatibilitäts-Komplex des Menschen, HLA-B 8 und/oder HLA-DR 3, signifikant weniger LIF - Freisetzung nach ConA-Stimulierung.

Der Leukozyten-Migrationshemmungs-Faktor LIF, als Parameter der Immunantwort auf polyklonale Mitogenstimulierung, findet sich auch bei anderen Autoren, vor allem als empfindliche Testsubstanz in der klinischen Diagnostik von Krankheiten mit Bezug zum Immunsystem.(HAHN et al.(1976), ASHKENAZI et al.(1978,1980), SZIGETI et al.(1980).

2.3. Die Mitogene ConcanavalinA (ConA) und Phytohämagglutinin (PHA) und ihre Wirkung

Als Mitogene werden Substanzen bezeichnet, die ruhende immunkompetente Zellen polyklonal aktivieren und in immunologisch aktive Zellen transformieren. Von größter Bedeutung sind die Pflanzenlektine ConA, ein Extrakt aus *Canavalia ensiformis*, und PHA, das Phytohämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris*.

Beide Mitogene stimulieren vorwiegend T-Lymphozyten (JANOSSY und GREAVES (1972), in unlöslicher Form allerdings auch B-Lymphozyten.

(ANDERSSON et al.(1972). Durch Entfernung der T-Lymphozyten mit spezifischem Anti-Theta-Serum (GREAVES et al.(1972), STOBO und PAUL (1972), und durch verschiedene andere Methoden zur Zellfraktionierung (JANOSSY und GREAVES (1969), GREAVES et al.(1972), BUSCHMANN und PAWLAS (1979), vor Stimulierung mit den Mitogenen ConA und PHA, konnte deren Spezifität für T-Zellen bewiesen werden. Eine weitere Unterteilung, in Subpopulationen von T-Lymphozyten, fanden DUTTON und HUNTER (1974) bei Mäusen durch den dosisabhängigen Suppressoreffekt von ConA-Stimulierung auf eine Antigen-Antwort, und durch den Nachweis einer Hemmungsaktivität für die gleiche Reaktion im Überstand der ConA-stimulierten Lymphozyten. Diese Beobachtungen wurden in den letzten Jahren von vielen Autoren bestätigt.

Rezeptoren für ConA und PHA wurden sowohl auf T-Lymphozyten, als auch auf B-Lymphozyten festgestellt.(GREAVES et al.(1972), LOOR et al. (1974). Beim Schwein wurden von SCHMID und CWIK (1973,1974) mit Hilfe der Hämagglutination Rezeptoren für beide Mitogene auf Lymphozyten nachgewiesen.

RAFFAEL und SELL (1982) fanden mit dem Elektronenmikroskop jeweils zwei Arten von Rezeptoren für ein Mitogen auf der Oberfläche von Kaninchenlymphozyten. Eine Rezeptorart, der Bindungsrezeptor, bleibt nach Kontakt mit dem entsprechenden Lektin unverändert, die andere Art, der funktionelle Rezeptor, wird mit dem gebundenen Lektinpartikel durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Diese Endozytose scheint eine Vorstufe oder Einleitung zur Zellaktivierung darzustellen, da Zellen mit unveränderten Rezeptoren nach 24 Stunden mikroskopisch keine Anzeichen

von Transformation erkennen liessen. Über die Zugehörigkeit der zur Endozytose fähigen Zellen zu bestimmten Subpopulationen konnte mit dieser Methode nichts ausgesagt werden.

Die Rezeptoren für die einzelnen Lektine unterscheiden sich; allerdings kann eine Zelle gleichzeitig Rezeptoren für ConA und PHA an ihrer Oberfläche aufweisen. Dadurch kommt es nicht zur Konkurrenz zwischen den Mitogenen während der Stimulierung.

2.4. Testverfahren zum Nachweis von Lymphokinen

Der Migrationshemmungstest

Zum Nachweis der Migrationshemmungsfaktoren MIF und LIF werden seit Jahren mehrere Verfahren als gleichwertig angesehen und eingesetzt. Die Auswahl der Methode wird von jeder Arbeitsgruppe individuell getroffen, unter Berücksichtigung der personellen und technischen Möglichkeiten.

Kapillarmethode

Die von GEORGE und VAUGHAN (1962) eingeführte Kapillarmethode, in der die Migrationszellen aus Mikrokapillaren in das umgebende Medium auswandern, wurde von einigen Autoren mit geringen Veränderungen übernommen. (BLOOM und BENNETT (1966), SOBORG und BENDIXEN (1967), FEDERLIN et al. (1971), JOKIPII und JOKIPII (1974), ROCKLIN (1974, 1975), SEYFARTH und KÖHLER (1980). In Bezug auf die Art der Migrationszellen, die Zusammensetzung der Medien, das Antigenangebot, die Anordnung der Kapillaren in den Testkammern, die Anzahl der Parallelansätze und die Auswertung der Migrationshöfe, haben DAVID et al. (1964), FLANAGAN et al. (1973), YOSHIDA und COHEN (1974), WATANUKI und HAGA (1977) und BERTOTTO et al. (1981) die Methode modifiziert. Mit der statistischen Auswertung der Kapillarmethode befassten sich

BERGSTRAND und KÄLLEN (1973), JOKIPII und JOKIPII (1974), FENTON und TAYLOR (1975) und WATANUKI und HAGA (1977).

Den Einfluß verschiedener Serumzusätze zum Medium untersuchten FOX et al.(1974) und BAER et al.(1978).

Die Durchführung der Kapillarmethode erfordert erheblichen technischen Aufwand. Auch wird die Anzahl der Parallelansätze durch die erforderliche große Blutmenge und den hohen Verbrauch an MIF-haltigem Überstand und Medium begrenzt.

Agarosemethode

Diese Nachteile der Kapillarmethode haben zur Entwicklung einer weiteren Nachweismethode geführt, die von CARPENTER et al.(1968), SALVIN und NISHIO (1969), CLAUSEN (1971,1972,1973 a,b,), GAINES et al.(1972),ASTOR et al.(1973),AVRILOMMI und RÄSÄNEN (1975) zur Untersuchung MIF-haltiger Überstände eingesetzt wurde. CLAUSEN (1973 b) hat sich kritisch mit der Technik dieser Agarose-Methode auseinandergesetzt und optimale Testbedingungen beschrieben. Seine Untersuchungen bilden die Grundlage für spätere immunologische und klinische Routineuntersuchungen.(BENDTZEN (1975,1976), HOFFMAN et al.(1975), GILL und KUNZ (1980),AGRUP et al. (1980), EMMRICH und FELBER (1980). In der Agarosemethode werden Testplatten mit antigenhaltigem Agarosemedium eingesetzt. Die zur Migration fähigen Zellen breiten sich während der Inkubationszeit aus den vorgestanzten Vertiefungen ringförmig zwischen Agaroseschicht und Schalenboden aus. CLAUSEN (1972) identifizierte die ausgewanderten Zellen als Leukozyten. Die kontaminierenden Erythrozyten, als nicht

wanderungsfähige Zellen, waren nur innerhalb der Stanzlöcher zu finden. BENDTZEN (1975) stellte bei einem Vergleich von Kapillar- und Agarosemethode fest, daß die enge Packung der Zellen in den Kapillaren keine aktive Bewegung ermöglicht, so daß die Zellen durch Diffusion und Molekularbewegung aus den Kapillaren verdrängt werden.

Eine Modifikation der Agarosemethode verwenden SALVIN und seine Arbeitsgruppe (SALVIN et al.(1969,1973), RUSCETTI et al.(1976), NETA et al.(1981) für ihre Grundlagenforschung. In ihrem Verfahren werden die Zellsuspensionstropfen auf die Oberfläche einer 0,5 %igen Agarmediumschicht aufgebracht.

GLASSER und FIEDERLEIN (1979), sowie DOOLEY und TAKAHASHI (1981) benutzen die Agarosemethode zur Untersuchung der Chemotaxis menschlicher Granulozyten. BELSHEIM (1981) untersucht Variationsmöglichkeiten der Standardtechnik. Die statistische Auswertung des Agaroseverfahrens findet sich bei DEN HOLLANDER et al. (1981).

Veterinärmedizinische Aspekte der Leukozytenmigration unter Agarose untersuchten ANSFIELD et al.(1980 beim Hund, GUTEKUNST (1978) beim Schwein und ROTH und KAEBERLE (1981) beim Rind.

Agarose-Mikrodroplet-Methode

Das Prinzip der Agarosetechnik wurde bei der Suche nach Mikromethoden für geringe Blutmengen durch die Einführung einer Agarose-Mikrodroplet-Methode weiterverfolgt. Bei einem Vergleich mit der herkömmlichen Kapillarmethode konnten HARRINGTON und STASTNY (1973) für die von ihnen entwickelte Methode vergleichbare Ergebnisse erzielen.

Beim Agarose-Mikrodroplet-Verfahren werden die Migrationszellen direkt in einem 0,2 %igen Agarosemedium resuspendiert und auf einen 0,8%igen Agaroseträger aufgebracht. Das antigenhaltige Medium wird nach dem Gelieren der Zelltropfen zugefügt. Beim Einsatz dieser Methode wird nur eine geringe Blutmenge benötigt. Auch der Mediumverbrauch kann durch die Verwendung von Multischalen mit kleinem Volumen eingeschränkt und die Zahl der Parallelansätze erhöht werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der erleichterten Auswertbarkeit der Migrationshöfe durch die scharfe innere Grenze, die durch den Rand des Agarosetropfens gebildet wird. Die Agarose-Mikrodroplet-Methode wird auf klinischem Gebiet von HAHN et al.(1976), McCOY et al.(1977), WEESE et al.(1978), ASHKENAZI et al.(1978, 1980) , FAHLBUSCH und DORNBERGER (1979), ADELMAN et al.(1980) und SZIGETI et al.(1980) eingesetzt. Von FILER et al.(1981) und PATTISON et al.(1981) stammen statistische Untersuchungen über die Einsetzbarkeit des Tests als Diagnoseverfahren.

Das Agarose-Mikrodroplet-Verfahren erwies sich für die vorliegende und eine parallel durchgeführte Arbeit mit anderer Zielsetzung (HAUNER (1984) als die am besten geeignete Methode zum Nachweis des Granulozyten-Migrationshemmungsfaktors LIF.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Schweine verschiedener Rassen, die alle aus dem Lehr- und Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der Universität München in Oberschleißheim stammten.

Untersucht wurden 63 Schweine aus sieben Familien (Vater, Mutter und Nachkommen) der Rassen Deutsches Landschwein, Pietrain, Göttinger Miniaturschwein. Bei einer Familie handelte es sich um einen Wildschweineber, eine DE/DL-Sau* und deren Nachkommen.

Die Tiere waren in verschiedenen Ställen untergebracht und unterschiedlichen Haltungsbedingungen unterworfen.

Die Elterntiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung ein bis drei Jahre alt. Die Ferkel wurden im Alter von zwei Monaten, bei einem Gewicht von 20 kg untersucht.

Die Abstammung der Versuchstiere wurde blutgruppenserologisch kontrolliert.**

Bei den erythrozytären Blutgruppen wurden folgende Systeme und Enzym-polymorphismen berücksichtigt: A, E, F, G, H, K, L und die Enzyme Amy-lase, 6-PGD, PHI und ADA.

* Kreuzung Deutsches Landschwein / Deutsches Edelschwein

** Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung der Tierzucht-forschung e.V., München

3.1.2. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte grundsätzlich am Tag des Migrationstests.

Ferkel wurden in Rückenlage mit gestrecktem Hals fixiert, die erwachsenen Tiere stehend mit einer Oberkieferschlinge an einer erhöhten Strebe festgebunden, wobei Kopf und Hals gestreckt wurden.

Den Tieren wurden 50 ml Blut aus der Vena cava cranialis bzw. Vena jugularis externa nach der von BOLLWAHN et al.(1982) und VOLLMERHAUS et al.(1982) veröffentlichten Methode entnommen.

Dazu wurde ein spezielles, im Blutgruppeninstitut seit Jahren für Routineuntersuchungen verwendetes Vakuumsystem benutzt. Es handelt sich dabei um eine Kombination aus Punktionskanüle, Infusionsschlauch und evakuierter Blutflasche (100 ml), die 10 ml Stabilisator zur Gerinnungshemmung enthält. Dieser Stabilisator setzte sich zusammen aus:

2,5 g	Natriumchlorid
30,0 g	Natriumcitrat
0,4 g	Natriumcyanid
0,5 g	Streptomycin
	Aqua dest. ad 1000,0 ml

Ein vorsichtiges Bewegen der Blutflasche verhinderte eine Hämolyse der Erythrozyten und führte zu einer gleichmäßigen Verteilung des entnommenen Blutes mit dem Stabilisator.

Selbst bei kleineren Ferkeln war die Blutentnahme mit dieser Technik problemlos.

3.1.3. Herstellung der im Test verwendeten Medien und Agarosepräparationen

Zur Standardisierung der Testbedingungen wurden alle verwendeten Materialien, wie Medien, Serum und Agarose*, in größeren Mengen vorbereitet und in geeigneten Portionen bei - 20 °C gelagert.

Herstellung der Medien:

100 g RPMI 1640 - Pulvermedium** wurden in 1000 ml Aqua bidest. zu einem zehnfach konzentrierten Stamm-Medium gelöst, sterilfiltriert und in 100 ml Portionen bei - 20 °C eingefroren. Aus diesem Stamm-Medium wurden die folgenden Medien hergestellt:

1. Kontrollmedium

Das einfach konzentrierte Medium wurde aus dem Stamm-Medium mit Aqua dest. durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 hergestellt. Zur Stabilisierung des pH-Werts während der Inkubation wurden 25 mM HEPES-Puffer*** (CLAUSEN (1973 b), zur Verhinderung einer bakteriellen Kontamination 100 µg/ml Streptomycin⁺ zugesetzt. Komplettiert wurde das Medium durch 20 % unverdünntes, gepooltes Kaninchenserum, das zuvor bei 56 °C inaktiviert wurde.

100 ml Kontrollmedium setzten sich zusammen aus:

80 ml	einfach konzentriertes Medium
20 ml	Kaninchenserum
25 mM	HEPES - Puffer
100 µg/ml	Streptomycin

Das Medium wurde auf pH 7,3 eingestellt und in 14 ml Portionen eingefroren.

* Merck, Darmstadt

** Boehringer, Mannheim

*** Serva, Feinbiochemica, Heidelberg

+ Streptothemat, Fa. Grünenthal, Stolberg

2. ConA-Medium:

100 ml ConA-Medium setzten sich zusammen aus:

- 80 ml einfach konzentriertes Medium
- 20 ml Kaninchenserum
- 25 mM HEPES
- 100 µg/ml Streptomycin
- 20 µg/ml ConA*

Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt, Portionen zu 14 ml abgefüllt und eingefroren.

3. PHA-Medium:

100 ml PHA-Medium setzten sich zusammen aus:

- 80 ml einfach konzentriertes Medium
- 20 ml Kaninchenserum
- 25 mM HEPES
- 100 µg/ml Streptomycin
- 10 µg/ml PHA**

Das Medium wurde auf pH 7,3 eingestellt und in 14 ml Portionen eingefroren.

4. Doppelt-konzentriertes Medium:

100 ml doppelt-konzentriertes Medium setzen sich zusammen aus:

- 60 ml doppelt-konzentriertes Medium***
- 40 ml Kaninchenserum
- 50 mM HEPES
- 200 µg/ml Streptomycin

Das Medium wurde auf pH 7,3 eingestellt und in Portionen zu 2 ml eingefroren.

*** das doppelt-konzentrierte Medium besteht aus einem Teil Stamm-Medium und fünf Teilen Aqua dest.

* ConcanavalinA, C-2010, Sigma, St.Louis, USA

** Phytohämagglutinin, Kidney bean, L-8754, Sigma, St.Louis, USA

Herstellung der Agarosepräparationen:

Der Granulozyten-Migrationstest wurde im Agarose-Mikrodroplet-Verfahren nach HARRINGTON und STASTNY (1973) durchgeführt, wobei unterschiedliche Agarosekonzentrationen (0,4 % und 0,8 %) benötigt wurden. (HAHN et al.(1976), ASHKENAZI et al.(1978).

Zur Herstellung der 0,4 % igen (0,8 %igen) Agarose wurden 0,4 g Agarose pro 100 ml (0,8 g Agarose/100ml) eingewogen und nach Zugabe der entsprechenden Menge Aqua dest. auf 80 °C erhitzt. Dabei löst sich das Agarosepulver. Beide Agarosepräparationen wurden in Portionen zu je 3 ml abgefüllt und bei - 20 °C gelagert.

Vorbereitungen für die Zellisolierung:

Zum Erreichen einer großen Zellausbeute bei der Isolierung von Lymphozyten und Granulozyten wurden alle Glasgefäße silikonisiert*, um eine Haftung vor allem von Granulozyten an den Glaswänden zu verhindern.

* Silikonlösung serva, Serva Feinbiochemica, Heidelberg

3.2. Methode

3.2.1. Direkter Granulozyten - Migrationstest

Beim direkten Granulozyten - Migrationstest wurden Granulozyten und mitogenstimulierte Lymphozyten eines Tieres gemeinsam 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Ziel dieser Untersuchung war, festzustellen, ob die unspezifische Stimulation von Lymphozyten durch Mitogene einen Einfluß auf die Migration der Granulozyten hat.

Zur Durchführung des Tests wurde das Agarose-Mikrodroplet-Verfahren nach HARRINGTON und STASTNY (1973) modifiziert.

Auf einer Trägerschicht aus 0,8 %iger Agarose wurden die Testzellen, Lymphozyten und Granulozyten desselben Tieres, mit Hilfe eines 0,2 % igen Agarosemediums (HAHN et al.(1976) fixiert und mit 0,5 ml mitogenhaltigem Medium oder Kontrollmedium 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit wandert ein Großteil der Granulozyten aktiv in das umgebende Medium aus, die Zellen bewegen sich dabei vorwiegend auf dem Boden des Testgefäßes. Nach 20 Stunden hatten sich um die zentralen Agarosedropfen dichte, kreisrunde Migrationshöfe gebildet, die mit einem Meßokular mit Skaleneinteilung unter dem Mikroskop ausgewertet wurden.

Als Mitogene dienten Concanavalin A (ConA) und das Phytohaemagglutinin von Phaseolus vulgaris (PHA). Beide Lektine stimulieren vorwiegend T-Lymphozyten. ConA wurde in einer Konzentration von 20 µg ConA/ ml Medium und PHA in der Konzentration von 10 µg/ ml Medium verwendet. Diese Konzentrationen wurden durch Vorversuche ermittelt.(HENRICH (1979).

Vorversuche:

Bedingung für den Migrationstest in der beschriebenen Form war, daß die wandernden Granulozyten als Zielzellen durch die Mitogene nicht beeinflußt werden durften. (SZIGETI et al.(1980). Um dieses zu prüfen, wurden isolierte Granulozyten mit ConA-Medium, PHA-Medium und Kontrollmedium inkubiert. Die Auswertung des Migrationstests ergab keine Unterschiede der Migrationsstrecken von mitogenhaltigen Ansätzen und Kontrollen.

Die Zugabe der mitogenhaltigen Medien hatte bei Abwesenheit von Lymphozyten keinen Einfluß auf die Migration der Granulozyten.

Durch die getrennte Isolierung von Lymphozyten und Granulozyten desselben Tieres (ASHKENAZI et al.(1978) war es möglich, die Lymphozyten vor dem Mischen der Zellen mit den Mitogenen zu inkubieren. Nach zwei, fünf und 18 Stunden Inkubation mit den Mitogenansätzen und dem Kontrollmedium wurden zellfreie Überstände gewonnen und im Migrationstest mit isolierten Granulozyten geprüft. Dabei ergaben sich bei allen Inkubationszeiten vergleichbare Werte der Migrationshemmungs-Indices, wobei die Wanderung in den Überständen der mit Mitogen vorinkubierten Lymphozyten im Gegensatz zu den Kontrollen deutlich gehemmt war.

Die Überstände mit 18 Stunden Vorinkubation zeigten im nachfolgenden Migrationstest Veränderungen im pH-Wert, so daß eine Schädigung der wandernden Zellen durch das Absinken des pH-Werts nicht ausgeschlossen werden konnte. Ein weiterer Nachteil war der große Zeitaufwand und die Notwendigkeit, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen Blut vom gleichen Tier zu entnehmen.

In weiteren Vorversuchen wurde festgestellt, daß auch eine direkte Inkubation der Lymphozyten während des Migrationstests möglich ist. (McCOY et al.(1977).

Damit ergab sich eine entscheidende Begrenzung des technischen Aufwands, eine Verminderung der Fehlerquellen im methodischen Bereich und ganz allgemein eine Verbesserung der Versuchsbedingungen.

3.2.2. Durchführung des Granulozyten -Migrationstests

3.2.2.1. Isolierung der Granulozyten im Dichtegradientenverfahren

Für die Isolierung der Granulozyten aus dem peripheren Blut wurde die Methode nach OTTO (1970) modifiziert.

30 ml venöses Blut, das 20 % Stabilisator enthielt, wurde im Verhältnis 5 : 1 mit 5 %iger Dextran*-Lösung (5 % Dextran, Mol.Gew. 250000, gelöst in 0,92 %iger NaCl-Lösung) versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit sedimentierten die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten reicherten sich im Überstand an. Diese Fraktion wurde mit einer Pasteurpipette vollständig abgezogen und im Verhältnis 3 : 1 auf Uromiro** (spezifisches Gewicht = 1,119)überschichtet.

Anschließend wurde 20 Minuten bei 4 °C und 400 g zentrifugiert. Die Granulozyten sedimentierten, Lymphozyten, Thrombozyten und noch vorhandene Erythrozyten befanden sich im Überstand.

Auch in der Granulozytenfraktion waren noch Erythrozyten vorhanden. Diese wurden mit 0,85 %iger Ammoniumchlorid-Lösung hämolysiert , während die Zellen 10 Minuten bei 4 °C und 100 g zentrifugiert wurden. Durch zweimaliges Waschen der Granulozyten in 0,92 %iger NaCl-Lösung (10 Minuten, bei 4 °C und 100 g) wurden die Erythrozytenreste entfernt und ein Reinheitsgrad von 98 % Granulozyten erreicht. Die Vitalität der Zellen wurde durch den Farbausschluß-Test mit Trypanblau*** festgestellt ; sie betrug durchschnittlich 98 %.

Nach dem zweiten Waschgang wurde der Überstand dekantiert und die übrige Flüssigkeit vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden in 2 ml 0,92 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und gezählt.

* T 250, Pharmacia, Schweden

** Köhler Chemie, Alsbach

*** Fluka, Buchs

3.2.2.2. Isolierung der Lymphozyten im Dichtegradientenverfahren

25 ml venöses Blut mit 20 % Stabilisator wurde in englumigen Reagenzgläsern (0,8 cm) im Verhältnis 1,5 : 1 auf Uromiro (spez.Gewicht 1,076) überschichtet und 20 Minuten bei 400 g zentrifugiert. (OTTO und SCHMID (1970). Lymphozyten und Thrombozyten reicherten sich in einer breiten Ringzone über den sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten an und konnten abpipettiert werden. Die Lymphozyten wurden zweimal in 0,92 % iger NaCl-Lösung gewaschen (10 min bei 100 g). Eine geringfügige Verunreinigung mit Erythrozyten hatte keinen Einfluß auf den Migrationstest, so daß eine Hämolyse der Erythrozyten zur Schonung der Zellen unterbleiben konnte.

Der Reinheitsgrad der Lymphozyten lag bei 90 %, der Prozentsatz der vitalen Zellen bei 99 Prozent.

Die Lymphozyten wurden nach dem zweiten Waschen in 4 ml 0,92 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und gezählt.

3.2.2.3. Zellzählung

Sowohl Lymphozyten, als auch Granulozyten wurden nach ihrer Isolierung in Erythrozyten - Zählpipetten im Verhältnis 1 : 200 mit 0,92 % iger NaCl-Lösung verdünnt und in einer Neubauer - Zählkammer ausgezählt. Erythrozyten - Zählpipetten wurden verwendet, da beide Zellarten nach der Isolierung in sehr hoher Dichte vorlagen und mit den Leukozyten - Zählpipetten höchstens eine Verdünnung von 1 : 20 erreicht werden kann. Bei höherer Verdünnung ergibt sich darüber hinaus eine grössere Zählgenauigkeit.

Ausgezählt wurden die Zellen in den vier großen Eckquadraten mit jeweils 16 kleinen Quadraten.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Z_x = \frac{Z}{A \times R \times V}$$

Z_x = Zellzahl/ μ l

Z = Zahl der ausgezählten Zellen

A = Anzahl der ausgezählten Quadrate

R = Rauminhalt der ausgezählten Quadrate

V = Verdünnung

Die für den Migrationstest erforderliche Zellzahl bezog sich auf die Granulozyten als Migrationszellen und betrug $2,5 \times 10^5$ Granulozyten/ μ l. Diese Zelldichte erwies sich nach einigen Vorversuchen als gut geeignet für den Test. Die Migrationsstrecke war dabei deutlich begrenzt, auch die Dichte der auswandernden Zellen konnte als optimal angesehen werden. Außerdem entsprach diese Zellzahl den Angaben in der Literatur.(CLAUSEN (1973 b)

Den Granulozyten wurden die Lymphozyten desselben Tieres im Verhältnis 3 : 1 beigefügt. (ASHKENAZI et al.(1978). Die Mengenverhältnisse wurden nach folgenden Formeln errechnet:

$$\text{Granulozytenzahl : 3} = \text{erforderliche Lymphozytenzahl}$$

War die Anzahl der ausgezählten Lymphozyten zu hoch, errechnete sich das erforderliche Lymphozytenvolumen folgendermaßen:

$$V_L = \frac{\text{erforderliche Lymphozytenzahl}}{\text{vorhandene Lymphozytenzahl}}$$

$$V_L = \text{Lymphozytenvolumen (ml)}$$

Waren zuwenig Lymphozyten vorhanden, berechnete sich das erforderliche Granulozytenvolumen nach der Formel:

$$V_G = \frac{\text{vorhandene Lymphozytenzahl} \times 3}{\text{vorhandene Granulozyten}}$$

$$V_G = \text{Granulozytenvolumen (ml)}$$

Das endgültige Volumen der Zellsuspension, bezogen auf $2,5 \times 10^5$ Granulozyten/ μ l, errechnete sich bei zuwenig Lymphozyten folgendermaßen:

$$V_x = \frac{V_G \times \text{vorhandene Granulozyten}}{250000}$$

$$V_x = \text{Endvolumen der Zellsuspension (ml)}$$

3.2.2.4. Präparation der Testplatten

Für den Granulozyten-Migrationstest wurden für Gewebekultur geeignete Multischalen* mit 6 x 4 zylindrischen Vertiefungen ($V = 1,7 \text{ ml}$) verwendet. Mit einer Hamilton-Mikroliterspritze** mit aufsetzbarem Teflonschlauch*** wurden in die Mitte jeder Schale 5 μl 0,8 %ige flüssige Agarose eingebracht und bei 37 °C zwei Stunden getrocknet. In dieser Zeit breiten sich die Tropfen zu einer dünnen, kreisförmigen Schicht auf dem planen Boden der Schale aus. Diese Agaroseschicht diente als Träger für die Zellsuspension und sorgte für eine gute Haftung der Zellen beim Übersichten mit Medium.

3.2.2.5. Einpipettieren der Zellen in die Testplatten

Die vorbereiteten Leukozytensuspensionen (Lymphozyten und Granulozyten desselben Tieres im Verhältnis 1 : 3), nach der Zellzählung in 0,92 %iger NaCl-Lösung, wurden nun fünf Minuten bei 4 °C und 100 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die restliche Flüssigkeit mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Zellsediment wurde auf 37 °C erwärmt und in der errechneten Menge (V_x) an 0,2 %igem Agarosemedium resuspendiert. Dieses Agarosemedium wurde immer kurz vor dem Verbrauch aus gleichen Teilen zweifach konzentriertem Medium und 0,4 %iger Agarose hergestellt. Da zur Verflüssigung der Agarose Temperaturen von 80 °C notwendig waren, die organischen Bestandteile des Mediums aber einer starken Erhitzung nicht standhielten, wurden beide Teile nach Abkühlen der Agarose bei 37 °C vermischt und sofort verwendet.

* Nunc, Dänemark

** Hamilton, Bonaduz, Schweiz

*** " " "

Auf die Agaroseschicht der, auf 37 °C vorgewärmten, Testplatten wurden jeweils 4 µl Zellsuspension aufgetropft. Um die Schicht besser sichtbar zu machen, wurden die Platten auf einem vorgewärmten, dunklen Untergrund einpipettiert.

Durch rasches Abkühlen der Testplatten auf 4 °C erstarrte die Agarose im Medium, die Zelltropfen waren dadurch fest mit der Unterlage verbunden und wurden durch das anschließende Überschichten mit Medium nicht mehr abgelöst.

Der Testansatz bestand aus zwölf Tropfen Zellsuspension. Von diesen wurden je vier mit 0,5 ml ConA-Medium, PHA-Medium und Kontroll-Medium überschichtet und beschriftet.

Die Platten wurden anschließend 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Platten zur Fixation der Migrationshöfe zwei Stunden bei 80 °C getrocknet. Die Rückstände des Mediums wurden mit Aqua dest. entfernt und die Platten erneut getrocknet.

3.2.3. Auswertung

Die Auswertung der Migration erfolgte im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop* bei Lupenvergrößerung. Zur Messung der Migrationsstrecke wurde ein Meßokular mit einer Strichplatte in Meßteilung** benutzt, wobei 100 Skalenteile der Meßteilung 10 mm entsprachen.

Die Zellen wanderten während der Inkubation ringförmig aus den Agarosetropfen der Zellsuspension aus. Der gleichmäßige und scharfe Rand des Agaroseträgers markierte die innere Begrenzung der Migrationshöfe. Die äußere Migrationsgrenze wurde im Bereich des Übergangs von hoher zu deutlich geringerer Zelldichte festgelegt.

(Bilddokumentation S. 29)

Jeder Migrationshof wurde in vier Richtungen vermessen, dabei galten die Skalenteile des Meßokulars als Einheit. Da jeder Testansatz aus vier Migrationshöfen bestand, wurden aus 16 Einzelwerten der Mittelwert ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und die Varianz (s^2) nach folgenden Formeln berechnet:

$$\bar{x} = \sum x_i / n ; \quad s^2 = \frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n}{n - 1}$$

Von jedem Tier wurden drei Werte festgehalten, nämlich $\bar{x}$ der Migrationsstrecken in ConA-Medium, PHA-Medium und Kontrollmedium.

Als Maß für die Reaktion der Lymphozyten auf die Mitogene wurde der Migrationshemmungsindex (MHI) nach folgender Formel errechnet:

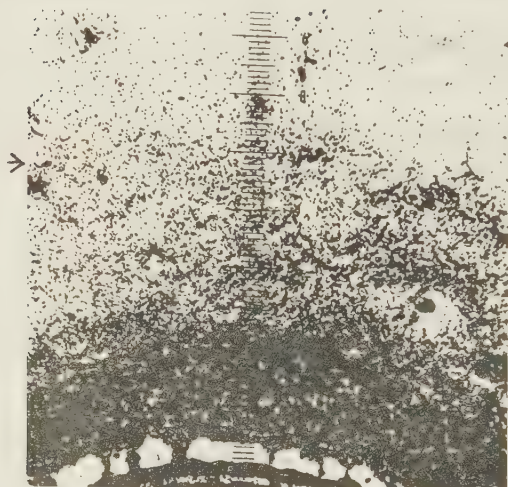
$$MHI = 100 - \frac{\bar{x} \text{ des Testansatzes}}{\bar{x} \text{ des Kontrollansatzes}}$$

* Wild, Herbrugg

** Wild, Herbrugg

Bilddokumentation :

Granulozytenmigrationshöfe



d



b

a = Kontrolle

b = Migrationshemmung nach PHA-Stimulierung

c = Migrationshemmung nach ConA-Stimulierung

Pfeile = äußere Migrationsgrenze



c

3.2.4. Lymphozytentypisierung

Die Lymphozyten aller Versuchstiere wurden auf ihre Histokompatibilitäts-Antigene im Standard-Mikro-Zytotoxizitätstest des NIH (National-Institut-of-Health) untersucht.

Bei diesem Test handelt es sich um ein Zwei-Stufen-Verfahren, in dem isolierte Lymphozyten zunächst mit Antilymphozytenserum (ALS) verschiedener Spezifitäten und anschließend mit Komplement inkubiert werden. Die komplementabhängige Zytolyse wird im Farbausschluß-Verfahren ermittelt.

Durchführung:

Schweinelymphozyten aus 3,0 ml peripherem Blut wurden im Dichtegradientenverfahren mit Uromiro (spez. Gewicht 1,076) isoliert. Verunreinigungen durch Erythrozyten wurden durch Hämolyse mit 0,85 %iger NH_4Cl -Lösung entfernt. Für den zytotoxischen Test wurde die Lymphozytensuspension auf eine Dichte von 3000 Zellen / μl eingestellt.

In Mikrokammern* wurden unter Decköl** jeweils 1 μl Antilymphozytenserum und 1 μl Lymphozytensuspension einpipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 27 °C wurde 1 μl Komplement (unverdünntes, mit Schweineerythrozyten absorbiertes Kaninchenserum) zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 60 Minuten wurden 0,5 μl einer 2 %igen Trypanblau-Lösung und nach weiteren 15 Minuten 1 μl 37% iges Formalin zugegeben.

Die Stärke der Zytolyse entspricht dem Prozentsatz der membrangeschädigten und dadurch angefärbten Zellen. Sie wurde im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop nach folgendem Schema ausgewertet:

* Möller-Coats, Norwegen

** Biotest-Institut, Frankfurt

unter	10 %	=	negativ
10	- 20 %	=	1
20	- 30 %	=	2
30	- 50 %	=	3
50	- 70 %	=	4
über	70 %	=	5

Die Lymphozytentypisierung wurde durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen der Merkmalsbildung im SLA-System (Swine-Lymphocyte-Antigen-System), dem Histokompatibilitäts-System des Schweines, und dem Grad der Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch Mitogene, nachgewiesen im Granulozyten-Migrationshemmungstest, zu untersuchen. Beim Menschen wurden ähnliche Untersuchungen von CARUSO und BELLINA (1983) durchgeführt.

Die geringe Anzahl der Versuchstiere aus sieben Familien und verschiedenen Rassen, lassen Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen dem Grad der Migrationshemmung und der Ausprägung bestimmter Lymphozytenantigene nicht zu.

4. ERGEBNISSE

4.1. Methode

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen Parameter der zellulären Immunität beim Schwein, die Migrationshemmung von Granulozyten durch mitogenstimulierte autologe Lymphozyten durch eine schnell und einfach durchführbare Methode zu charakterisieren. Dazu wurde ein kombinierter Stimulations- und Migrationstest verwendet, der es ermöglichte, die Verhältnisse *in vivo* zu simulieren.

Lymphozyten wurden durch die Mitogene ConA und PHA stimuliert und zur Bildung von Lymphokinen angeregt. Zum Nachweis dieser Lymphokinaktivität diente die Migrationshemmung der autologen Granulozyten im Migrationstest.

Die Vorteile und Möglichkeiten der Methode werden im folgenden erläutert:

Der Test erfordert nur geringen apparativen Aufwand.

Die Verwendung der Mitogene ConA und PHA zur unspezifischen Stimulierung der Lymphozyten vermindert Zeit- und Arbeitsaufwand, da keine vorherige Immunisierung wie bei Stimulierung mit einem spezifischen Antigen erforderlich ist.

Durch Standardisierung der Testbedingungen und Verwendung von Material aus einer Charge können die methodischen Fehler niedrig gehalten werden.

Die Kombination von Lymphozytenstimulation und Granulozytenmigration in einem Test hat den Vorteil, daß den Tieren nur einmal Blut entnommen werden muß. Die erforderliche Blutmenge (50 ml) ermöglicht auch die Untersuchung von Ferkeln, ohne die Tiere zu gefährden. Diese Menge reicht außerdem noch zur Bestimmung der erythrozytären und lymphozytären Blutgruppen aus.

Die getrennte Isolierung von Granulozyten und Lymphozyten mit unterschiedlichen Dichtegradienten liefert eine ausreichend große Anzahl Zellen von hoher Reinheit und Vitalität. Vorversuche mit drei kleineren Familien (Tab.8,9,10), in denen beide Zellarten in einem Arbeitsgang mit Uromiro (spez.Gewicht 1,076) isoliert wurden, ergaben geringere Zellzahlen und verminderte Reinheit. Die Werte der Migrationsstrecken lagen bei diesen Tieren in den Kontrollansätzen sehr niedrig, so daß eine Schädigung der Granulozyten während der Isolierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Dieses Verfahren wurde daher als nicht geeignet angesehen und nicht mehr angewandt.

Im Gegensatz zu den Migrationstests, die in der Literatur beschrieben werden, wurden in diesem Verfahren, wie bei ASHKENAZI et al.(1978), konstante Granulozyten- und Lymphozytenzahlen in allen Testansätzen beibehalten. Die Granulozytenzahl betrug immer $7,5 \times 10^5$ Granulozyten pro 4 μ l, die Lymphozytenzahl $2,5 \times 10^5$ Lymphozyten/ 4 μ l, die Gesamtzahl der Leukozyten $1,0 \times 10^6$ Leukozyten/ 4 μ l. Dadurch konnten Unterschiede in der individuellen Zusammensetzung der Leukozyten ausgeglichen werden. Diese Versuchsanordnung erlaubt einen direkten, quantitativen Vergleich der Migrationshemmungsindices verschiedener Tiere.

Ein weiterer Vorteil des Tests ist der vergleichbar geringe Zeitaufwand zwischen Blutentnahme und Ende der Inkubationszeit von durchschnittlich 30 Stunden. Zellisolierung, Zählvorgang und Einpipettieren erfordern für sechs Tiere ungefähr fünf Stunden Arbeitszeit, wobei die Zählung der insgesamt zwölf Zellpräparationen, das Ausrechnen der erforderlichen Volumina und das Zusammenmischen der autologen Zellen durchschnittlich zwei Stunden erfordern.

Die Zellen befinden sich in dieser Vorbereitungsphase höchstens zwei Stunden lang im selben Medium; nach dem Resuspendieren in Agarose-medium und dem Überschichten mit Testmedium folgen dann allerdings 20 Stunden Inkubationszeit, in der sich das umgebende Medium mit den Stoffwechselabbauprodukten der Testzellen anreichert. Eine Übersäuerung des Mediums kann durch Pufferzugabe (25 mM HEPES/ ml Medium) verhindert werden. Diese Pufferkapazität genügt, um den eingestellten pH-Wert während der Inkubation konstant zu halten. Bei ausreichender Menge an Nährmedium können die Zellen diesen Zeitraum ohne Funktionsverlust überstehen. Ein Mediumwechsel, der zum Abschwemmen von Zellen führen kann, ist daher nicht erforderlich.

Der Zeitablauf des Migrationstests mit Blutentnahme am Morgen, Zellisolierung und Einpipettieren bis zum späten Nachmittag, danach Inkubation bis zum Mittag des folgenden Tages, erlaubt die Durchführung von Tests an aufeinanderfolgenden Tagen.

Durch Fixierung der Migrationshöfe (Trocknung bei 80 °C) nach Abschluß der Inkubation kann die zeitaufwendige mikroskopische Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

4.1.1. Anwendungsmöglichkeiten des kombinierten Testverfahrens

Mit Hilfe des kombinierten Stimulations- und Migrationstests können Aussagen über das Immunsystem eines Tieres gemacht werden.

A. Reaktion auf Mitogenstimulierung

Die Fähigkeit der Lymphozyten, auf eine Stimulierung mit der Bildung löslicher Mediatoren zu reagieren, kann durch die Ausbildung einer Migrationshemmungsaktivität beurteilt werden.

Die Fähigkeit der Granulozyten, auf diese Mediatoren zu reagieren, wird durch den Grad der Migrationshemmung sichtbar, wobei die Migrationsstrecke im Kontrollansatz Aufschluß über das Migrationsvermögen, d.h. die Funktionsfähigkeit der Granulozyten, gibt. Hier zeigt es sich, daß einzelne Tiere zwar eine gute Migration aufweisen, die Antwort auf die Lymphozytenstimulierung aber sehr gering ausfällt. Diese Tiere haben vor allem für ConA Migrationshemmungsindices unter 20 %.(Tab.16,17; Tier 57, 123, 188, 621, Theo)

B. Mehrfachuntersuchungen

Da die untersuchten Parameter, wie in Tabelle 11 ersichtlich, nur den augenblicklichen Status des Immunsystems wiedergeben, empfiehlt es sich, durch eine größere Anzahl von Untersuchungen am selben Tier in bestimmten Zeitabständen, die Reaktionsbreite der Migrationshemmung zu messen. Die Verbindung der Untersuchung der zellulären Immunität mit einer eingehenden klinischen Untersuchung, ergänzt durch eine serologische Titerkontrolle von Antikörpern bei bestimmten Infektionskrankheiten, kann die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse erhöhen.

C. Belastungstest

Durch eine definierte Belastung des Immunsystems kann die Reaktionsfähigkeit von Lymphozyten und Granulozyten durch den Umfang der Abweichung vom Status vor der Belastung beurteilt werden.

Familienuntersuchungen, bzw. die Untersuchung mehrerer Familien einer Rasse, unter Belastung, können Zusammenhänge zwischen genetischen Merkmalen und zellulärer Reaktionsbereitschaft erkennen lassen.

4.2. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

4.2.1. Granulozytenmigration nach Stimulierung autologer Lymphozyten durch die Mitogene ConA und PHA

Untersucht wurden sieben Schweinefamilien verschiedener Rassen. In den folgenden Tabellen und Abbildungen werden die Mittelwerte $\bar{x}$ der Migrationsstrecken von Kontrollen und Mitogenansätzen und der Migrationshemmungsindex (% MHI) nach Familien geordnet dargestellt. Dieser Index ist ein Maß für die Lymphozytenfunktion nach Stimulierung durch Mitogene.

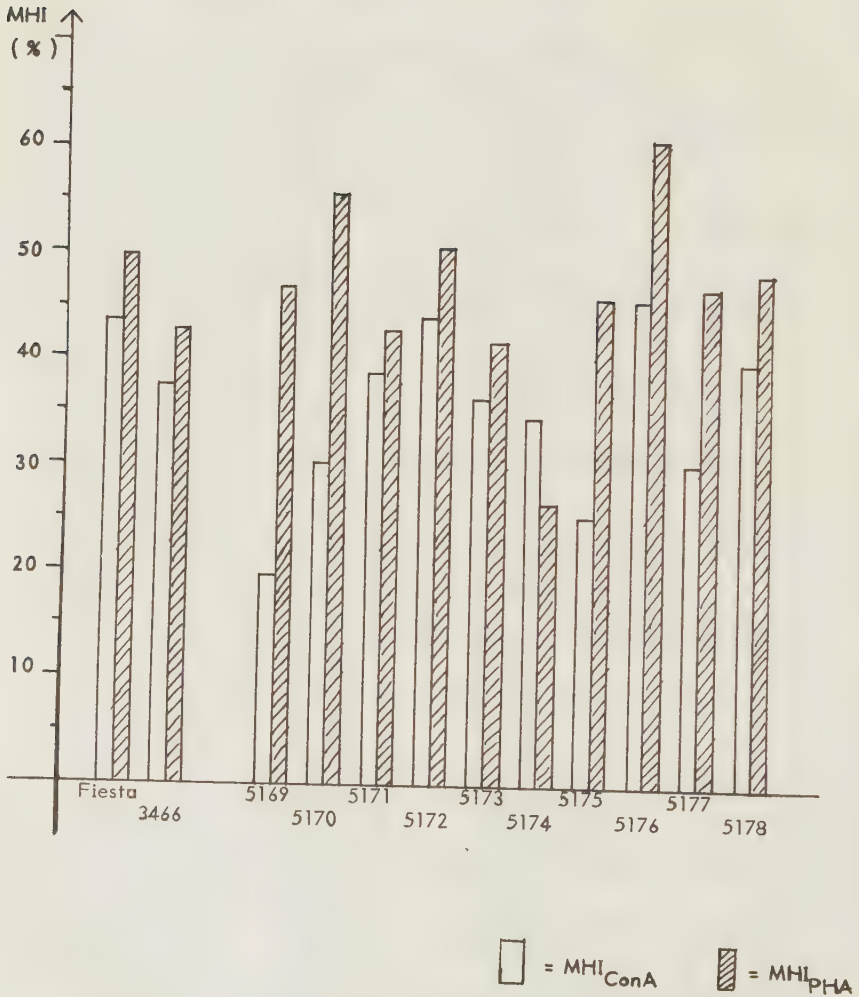
Zur Beurteilung der Granulozytenmigration ist die Migrationsstrecke in den Kontrollansätzen von Bedeutung, da Aktivität und Stabilität der Granulozyten von optimierten Testbedingungen abhängig sind. Nach der Zellsolierung kann im Farbausschlußtest mit Trypanblau nur die Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt werden, nicht aber, ob ihre Funktionsfähigkeit noch erhalten ist.(FORD (1978). Zur Funktion der Granulozyten gehört sowohl die Fähigkeit aktiv zu wandern, als auch ihre Bereitschaft, auf die anderen Zellen des Immunsystems und deren Mediatoren zu reagieren. Die Migration in den Kontrollen kann daher als Funktionsprüfung der Granulozyten angesehen werden.(Tab.16,17)

Tab. 1 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 1, Deutsche Landrasse; V: Fiesta, M: 3466
 Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices ($\%MHI$) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: Fiesta	7.3.83	Kontrolle	43,70	+	5,47	---
		ConA	24,50	+	4,42	43,94
		PHA	21,88	+	3,48	49,90
M: 3466	7.3.83	Kontrolle	35,00	+	2,83	---
		ConA	21,88	+	3,91	37,49
		PHA	20,06	+	2,02	42,69
5169	6.4.83	Kontrolle	44,50	+	2,39	---
		ConA	35,81	+	3,54	19,52
		PHA	23,69	+	2,39	46,76
5170	6.4.83	Kontrolle	54,69	+	2,75	---
		ConA	38,19	+	4,55	30,17
		PHA	24,31	+	2,02	55,55
5171	7.4.83	Kontrolle	51,75	+	2,44	---
		ConA	31,75	+	2,24	38,65
		PHA	29,94	+	2,02	42,74
5172	6.4.83	Kontrolle	46,00	+	6,28	---
		ConA	25,75	+	2,72	44,02
		PHA	22,69	+	4,28	50,67
5173	6.4.83	Kontrolle	48,75	+	4,78	---
		ConA	31,00	+	1,96	36,41
		PHA	28,44	+	4,95	41,66
5174	7.4.83	Kontrolle	49,69	+	2,02	---
		ConA	32,50	+	2,22	34,59
		PHA	36,38	+	3,32	26,79
5175	7.4.83	Kontrolle	47,50	+	2,07	---
		ConA	35,42	+	3,29	25,43
		PHA	25,67	+	3,63	45,96
5176	7.4.83	Kontrolle	44,50	+	4,75	---
		ConA	24,19	+	2,51	45,64
		PHA	17,38	+	2,78	60,94
5177	7.4.83	Kontrolle	46,00	+	2,78	---
		ConA	32,06	+	3,59	30,30
		PHA	24,38	+	3,95	47,00
5178	7.4.83	Kontrolle	51,25	+	3,84	---
		ConA	30,83	+	4,15	39,94
		PHA	26,42	+	1,31	48,45

Abb. 1

Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 1, Fiesta x 3466, Deutsche Landrasse
Angaben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindices für ConA und PHA.

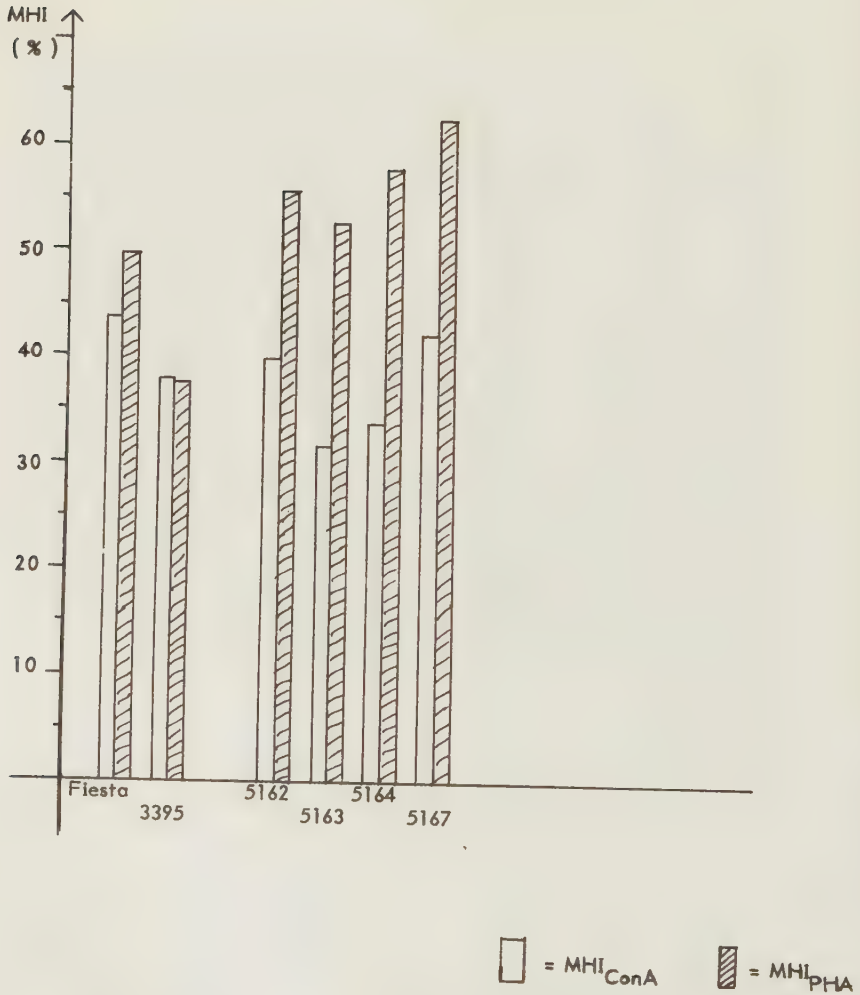


Tab. 2 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 2, Deutsche Landrasse; V: Fiesta, M: 3395
 Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: Fiesta	7.3.83	Kontrolle	43,70	$\pm$	5,47	---
		ConA	24,50	$\pm$	4,42	43,94
		PHA	21,88	$\pm$	3,48	49,90
M: 3395	7.3.83	Kontrolle	51,75	$\pm$	2,86	---
		ConA	32,17	$\pm$	2,72	37,84
		PHA	32,25	$\pm$	3,11	37,68
5162	6.4.83	Kontrolle	50,13	$\pm$	4,13	---
		ConA	30,10	$\pm$	4,07	39,95
		PHA	22,06	$\pm$	2,24	56,00
5163	6.4.83	Kontrolle	45,69	$\pm$	3,05	---
		ConA	31,25	$\pm$	3,64	31,60
		PHA	21,56	$\pm$	2,71	52,81
5164	6.4.83	Kontrolle	35,00	$\pm$	3,79	---
		ConA	23,13	$\pm$	2,66	33,91
		PHA	14,81	$\pm$	2,48	57,69
5167	6.4.83	Kontrolle	56,06	$\pm$	3,29	---
		ConA	32,44	$\pm$	2,31	42,13
		PHA	21,00	$\pm$	2,99	62,54

Abb. 2

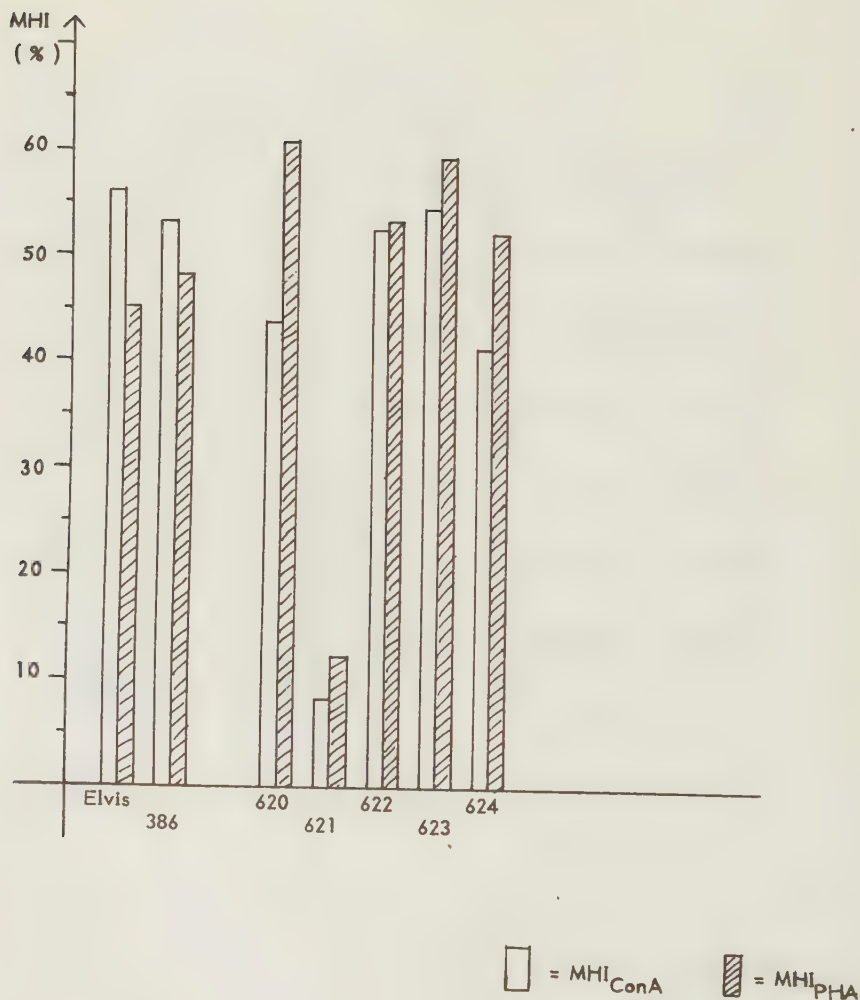
Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 2, Fiesta x 3395, Deutsche Landrasse,
Angabe werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindices für ConA und PHA.



Tab. 3 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 3, Deutsche Landrasse, DNP-Programm; V: Elvis, M: 386
 Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices (% MHI) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: Elvis	7.3.83	Kontrolle	41,88	+	4,55	---
		ConA	18,33	+	2,87	56,23
		PHA	22,94	+	2,84	45,22
M: 386	28.2.83	Kontrolle	36,50	+	2,28	---
		ConA	15,25	+	2,65	53,42
		PHA	17,00	+	2,80	58,22
620	19.4.83	Kontrolle	43,42	+	2,87	---
		ConA	24,33	+	2,35	43,97
		PHA	17,00	+	2,26	60,85
621	19.4.83	Kontrolle	53,12	+	1,63	---
		ConA	48,75	+	3,91	8,23
		PHA	46,58	+	3,15	12,31
622	19.4.83	Kontrolle	50,19	+	2,71	---
		ConA	23,81	+	3,04	52,56
		PHA	23,42	+	2,47	53,34
623	19.4.83	Kontrolle	45,17	+	1,03	---
		ConA	20,50	+	2,07	54,63
		PHA	18,38	+	2,20	59,31
624	19.4.83	Kontrolle	49,25	+	2,18	---
		ConA	28,81	+	4,35	41,50
		PHA	23,56	+	2,73	52,16

Abb. 3 Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 3, Elvis x 386, Deutsche Landrasse,
Angabe werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindices für ConA und PHA.

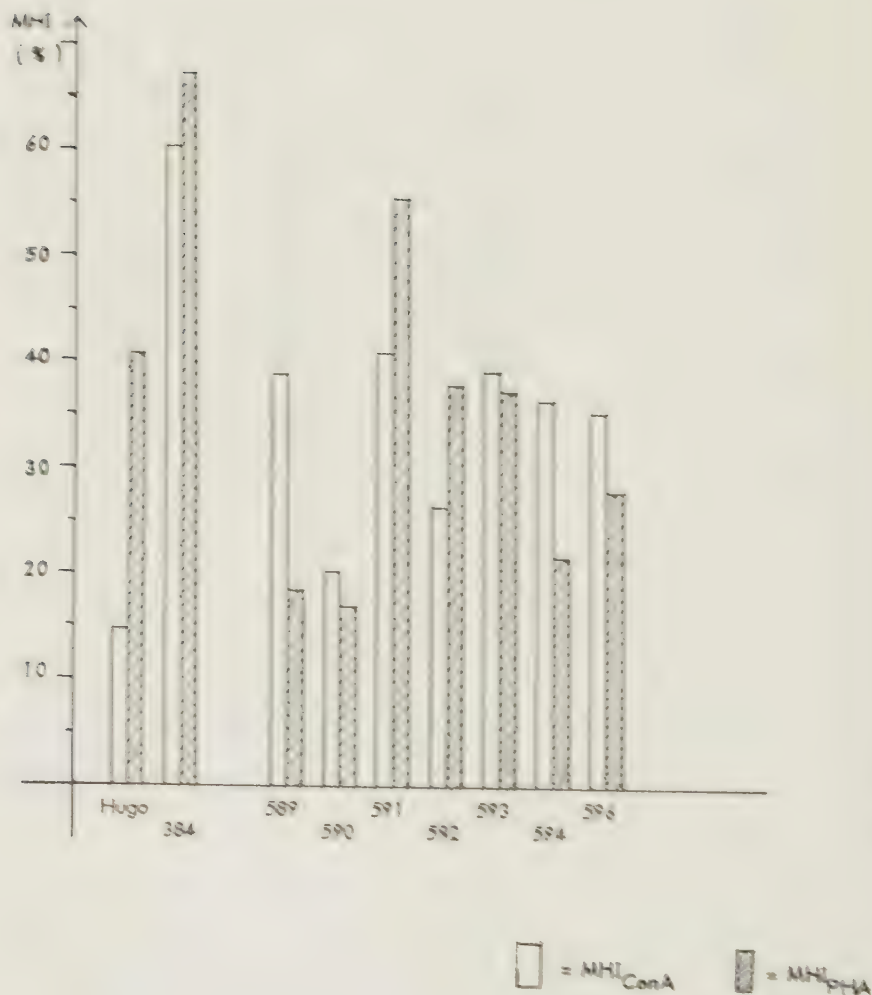


Tab. 4 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 4, Deutsche Landrasse, DNP-Programm; V: Hugo, M: 384
 Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices (%MHI) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: Hugo	16.2.83	Kontrolle	34,50	$\pm$	3,33	---
		ConA	30,75	$\pm$	4,84	14,84
		PHA	23,00	$\pm$	4,72	40,88
M: 384	22.3.83	Kontrolle	34,00	$\pm$	3,43	---
		ConA	13,44	$\pm$	1,93	60,47
		PHA	11,13	$\pm$	1,86	67,26
589	18.4.83	Kontrolle	43,20	$\pm$	2,78	---
		ConA	26,42	$\pm$	5,07	38,84
		PHA	35,33	$\pm$	2,06	18,22
590	19.4.83	Kontrolle	49,31	$\pm$	2,06	---
		ConA	39,42	$\pm$	2,19	20,06
		PHA	40,94	$\pm$	2,95	16,97
591	18.4.83	Kontrolle	48,75	$\pm$	4,28	---
		ConA	28,88	$\pm$	2,42	40,78
		PHA	21,88	$\pm$	2,16	55,12
592	18.4.83	Kontrolle	46,44	$\pm$	2,53	---
		ConA	34,25	$\pm$	3,77	26,25
		PHA	29,00	$\pm$	4,59	37,53
593	18.4.83	Kontrolle	38,44	$\pm$	4,03	---
		ConA	23,44	$\pm$	2,50	39,02
		PHA	24,06	$\pm$	2,43	37,41
594	18.4.83	Kontrolle	25,56	$\pm$	1,79	---
		ConA	16,25	$\pm$	2,86	36,42
		PHA	20,13	$\pm$	2,16	21,24
596	18.4.83	Kontrolle	44,25	$\pm$	4,01	---
		ConA	28,69	$\pm$	2,77	35,19
		PHA	31,94	$\pm$	3,09	27,82

Abb. 4

Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 4, Hugo x 384, Deutsche Landrasse.
Angaben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindizes für ConA und PHA.

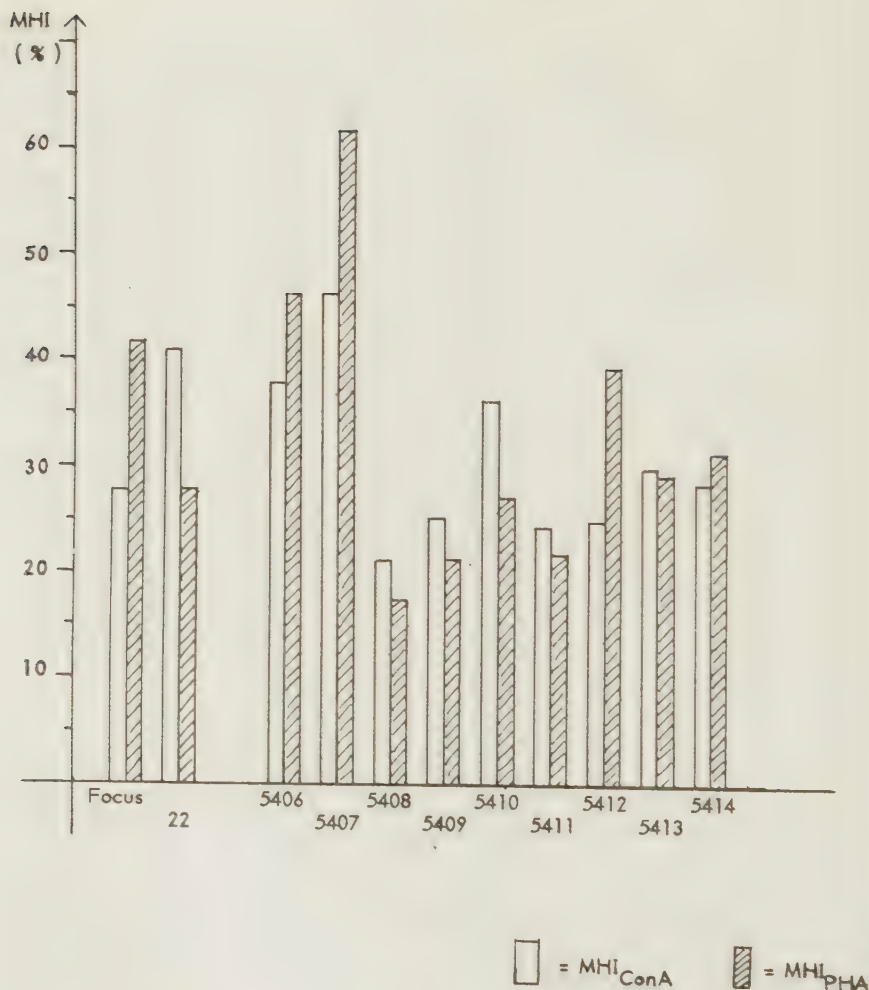


Tab. 5 Ergebnis des Migrationstests der Familie 5, Pietrain,
V: Focus, M: 22
Angabegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standard-
abweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle
und Testansätzen, sowie der Migrationshemmungsindex
(% MHI) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke $\bar{x}$ $\pm$ s			MHI (%)
V: Focus	16.2.83	Kontrolle	37,81	+	3,04	---
		ConA	25,00	+	3,08	27,55
		PHA	19,81	+	3,95	41,62
M: 22	24.5.83	Kontrolle	55,75	+	2,65	---
		ConA	33,00	+	2,55	40,81
		PHA	29,25	+	2,62	47,53
5406	17.5.83	Kontrolle	56,06	+	3,82	---
		ConA	34,94	+	1,69	37,67
		PHA	30,19	+	2,26	46,15
5407	17.5.83	Kontrolle	54,69	+	2,30	---
		ConA	29,50	+	3,25	46,06
		PHA	22,00	+	2,53	61,82
5408	17.5.83	Kontrolle	37,00	+	3,69	---
		ConA	29,44	+	4,83	20,43
		PHA	30,63	+	2,87	17,22
5409	18.5.83	Kontrolle	43,00	+	2,78	---
		ConA	32,25	+	2,05	25,00
		PHA	33,94	+	1,29	21,07
5410	17.5.83	Kontrolle	49,75	+	3,30	---
		ConA	31,81	+	2,40	36,06
		PHA	36,33	+	1,30	26,98
5411	18.5.83	Kontrolle	43,81	+	2,93	---
		ConA	33,25	+	2,17	24,11
		PHA	34,25	+	1,65	21,82
5412	18.5.83	Kontrolle	35,88	+	1,41	---
		ConA	26,94	+	1,84	24,92
		PHA	21,81	+	1,83	39,21
5413	17.5.83	Kontrolle	44,75	+	3,77	---
		ConA	31,50	+	2,31	29,61
		PHA	31,69	+	1,89	29,18
5414	17.5.83	Kontrolle	47,69	+	1,82	---
		ConA	34,25	+	2,89	28,18
		PHA	32,81	+	2,26	31,20

Abb. 5

Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 5, Focus x 22, Pletrain.
Angabe werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindizes für ConA und PHA.

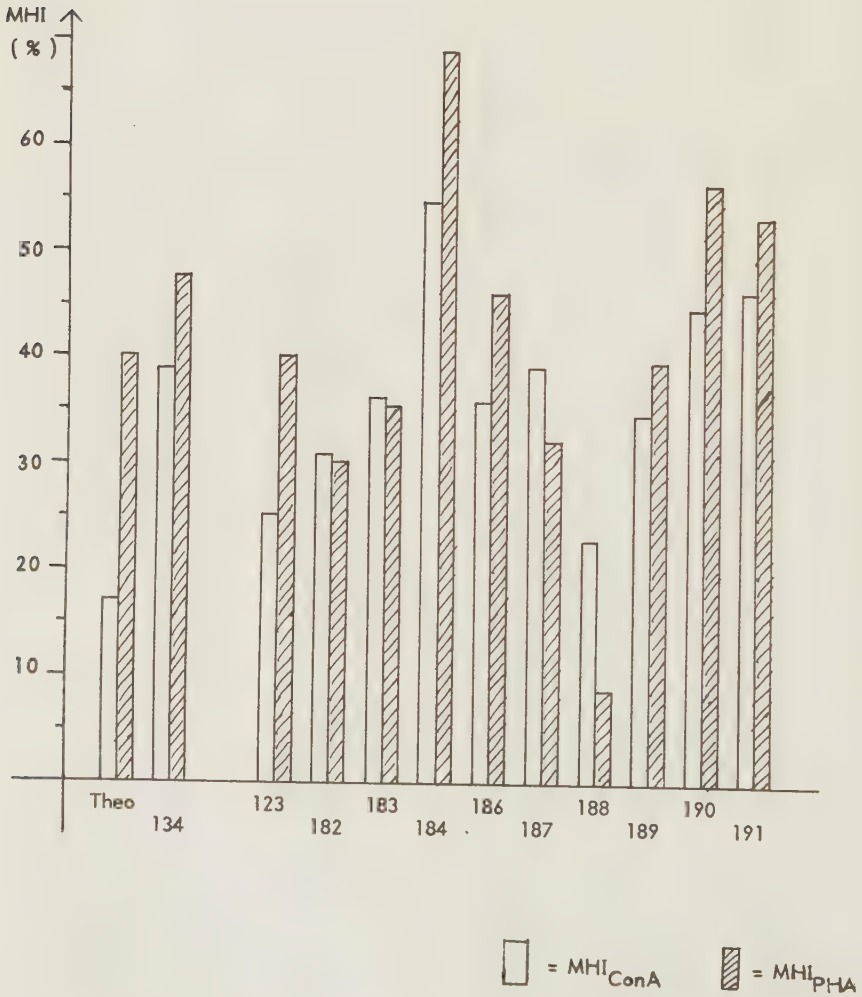


Tab. 6 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 6, Kreuzung Wildschweineber mit DE/DL-Sau; V: Theo, M: 134
Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices (% MHI) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: Theo	7.6.83	Kontrolle	57,25	+	2,18	---
		ConA	47,31	+	1,58	17,36
		PHA	34,19	+	3,97	40,28
M: 134	24.5.83	Kontrolle	48,06	+	2,51	---
		ConA	29,33	+	1,92	38,97
		PHA	25,17	+	3,27	47,63
123	18.5.83	Kontrolle	54,25	+	2,62	---
		ConA	40,60	+	2,68	25,16
		PHA	32,50	+	1,46	40,09
182	31.5.83	Kontrolle	54,75	+	2,79	---
		ConA	37,81	+	1,76	30,94
		PHA	38,13	+	2,60	30,06
183	31.5.83	Kontrolle	41,94	+	3,17	---
		ConA	26,81	+	1,51	36,08
		PHA	27,13	+	3,14	35,31
184	26.5.83	Kontrolle	40,31	+	2,55	---
		ConA	18,25	+	1,98	54,73
		PHA	12,50	+	1,93	69,00
186	26.5.83	Kontrolle	63,00	+	2,30	---
		ConA	40,44	+	3,24	35,81
		PHA	33,94	+	2,95	46,13
187	31.5.83	Kontrolle	55,63	+	2,78	---
		ConA	33,75	+	3,07	39,33
		PHA	37,69	+	3,20	32,25
188	31.5.83	Kontrolle	52,69	+	2,18	---
		ConA	40,63	+	3,89	22,88
		PHA	48,06	+	3,75	8,79
189	26.5.83	Kontrolle	45,25	+	3,26	---
		ConA	29,56	+	2,09	34,67
		PHA	27,38	+	2,80	39,49
190	18.5.83	Kontrolle	44,81	+	2,14	---
		ConA	24,75	+	1,81	44,77
		PHA	19,50	+	2,22	56,48
191	26.5.83	Kontrolle	61,94	+	1,73	---
		ConA	33,19	+	2,23	46,42
		PHA	28,94	+	2,05	53,28

Abb. 6

Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 6, Theo x 134, Wildeber x DE/DL-Sau
Angabegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindices für ConA und PHA.

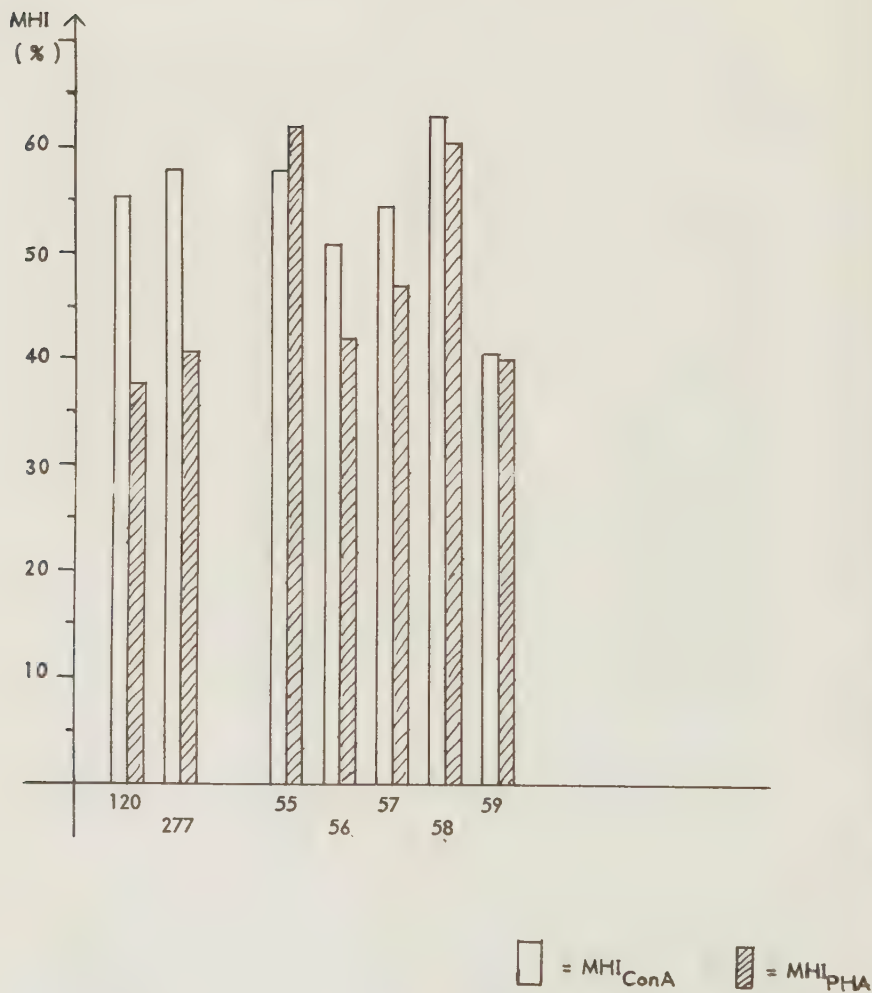


Tab. 7 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 7, Göttinger Miniaturschwein ; V: 120, M: 277

Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices (% MHI) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: 120	25.1.83	Kontrolle	16,13	+	2,13	---
		ConA	7,19	+	1,17	55,43
		PHA	10,06	+	1,96	37,63
M: 277	26.5.83	Kontrolle	45,33	+	2,93	---
		ConA	19,06	+	2,46	57,95
		PHA	26,81	+	2,40	40,86
55	24.5.83	Kontrolle	45,94	+	4,11	---
		ConA	19,50	+	1,75	57,55
		PHA	17,42	+	1,88	62,08
56	24.5.83	Kontrolle	44,19	+	2,71	---
		ConA	21,67	+	2,23	50,96
		PHA	25,63	+	1,60	42,00
57	24.5.83	Kontrolle	50,25	+	3,09	---
		ConA	22,88	+	1,96	54,47
		PHA	26,62	+	2,96	47,02
58	24.5.83	Kontrolle	34,12	+	2,68	---
		ConA	12,63	+	2,26	62,98
		PHA	13,50	+	2,84	60,43
59	26.5.83	Kontrolle	61,94	+	2,54	---
		ConA	36,92	+	2,02	40,39
		PHA	37,19	+	2,88	39,96

Abb. 7 Graphische Darstellung der Ergebnisse des Migrations-
tests der Familie 7, 120 x 277, Göttinger Miniaturschwein
Angabe werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindizes für ConA und PHA



Die nun folgenden Familien (8,9,10) gehen nicht in die Auswertung des eigentlichen Versuches ein. Bei diesen Tieren wurde ein anderes Isolierungsverfahren verwendet.(siehe S. 33)

Tab. 8 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 8, Göttinger
Miniaturschwein; V: 120, M: 304

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			x	+	s	
V: 120	25.1.83	Kontrolle	16,13	+	2,13	---
		ConA	7,19	+	1,17	55,43
		PHA	10,06	+	1,96	37,63
M: 304	25.1.83	Kontrolle	9,33	+	2,46	---
		ConA	7,00	+	2,95	25,00
		PHA	4,63	+	1,20	50,40
40	25.1.83	Kontrolle	16,94	+	2,23	---
		ConA	8,38	+	3,48	50,53
		PHA	11,00	+	2,45	35,07
45	25.1.83	Kontrolle	19,88	+	2,06	---
		ConA	13,50	+	1,55	32,09
		PHA	10,19	+	2,01	48,74

Tab. 9 Ergebnisse des Migrationstests der Familie 9, Göttinger
Miniaturschwein; V:118, M: 143

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			x	+	s	
V: 118	1.2.83	Kontrolle	8,81	+	1,83	---
		ConA	5,00	+	0,97	43,25
		PHA	5,88	+	1,75	33,26
M: 143	1.2.83	Kontrolle	14,50	+	2,45	---
		ConA	5,25	+	1,91	63,80
		PHA	8,19	+	1,76	43,50
39	1.2.83	Kontrolle	9,69	+	3,00	---
		ConA	4,00	+	1,41	58,72
		PHA	2,94	+	0,37	69,66
41	1.2.83	Kontrolle	7,69	+	1,70	---
		ConA	3,06	+	1,48	60,20
		PHA	4,13	+	1,55	46,36
42	8.2.83	Kontrolle	9,50	+	2,00	---
		ConA	7,44	+	1,50	21,68
		PHA	5,63	+	1,31	40,74

Tab. 10 Ergebnis des Migrationstests der Familie 10, Göttinger
Miniaturschwein; V: 118, M: 834

Tier Nr.:	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
V: 118	1.2.83	Kontrolle	8,81	$\pm$	1,83	---
		ConA	5,00	$\pm$	0,97	43,25
		PHA	5,88	$\pm$	1,75	33,26
M: 834	8.2.83	Kontrolle	12,06	$\pm$	1,53	---
		ConA	6,94	$\pm$	1,53	42,45
		PHA	5,25	$\pm$	1,91	56,47
43	8.2.83	Kontrolle	19,25	$\pm$	2,52	---
		ConA	7,13	$\pm$	1,54	62,96
		PHA	6,44	$\pm$	1,71	55,00
44	8.2.83	Kontrolle	11,25	$\pm$	1,98	---
		ConA	6,50	$\pm$	1,41	42,22
		PHA	4,69	$\pm$	2,18	58,31

4.2.2. Vergleich der Stimulierbarkeit der Lymphozyten eines Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Zur Prüfung der Stimulierbarkeit der Lymphozyten an verschiedenen Tagen und unter veränderten Umweltbedingungen wurden einzelne Tiere mehrfach untersucht. (Tab. 11, Abb. 8)

Es handelte sich um vier Sauen der Deutschen Landrasse (361,370,384,3395), die in der Zucht eingesetzt wurden und daher über einen längeren Zeitpunkt zur Verfügung standen. Die Tiere 384 und 3395 sind gleichzeitig Muttertiere der Familien 2 (3395) und 4 (384). Alle Tiere befanden sich zu den einzelnen Untersuchungsterminen in den gleichen Stallungen. Bei der ersten Blutentnahme waren die Muttersauen 361, 370 und 384 mit ihren Ferkeln im Abferkelstall untergebracht, die zweite und dritte Entnahme fand im Zuchtstall statt. Die hochtragenden Sauen werden aus diesem Zuchtstall eine Woche vor dem Geburtstermin in den Abferkelstall umgestellt. Vorher werden sie routinemäßig entwurmt und gegen Ektoparasiten behandelt, dieser Vorgang wiederholt sich nach dem Absetzen der Ferkel und vor der Rückkehr der Sauen in den Zuchtstall.

Die Sau 3395 wurde im Gegensatz zu den drei anderen Tieren erst kurz nach der erneuten Umstellung in den Zuchtstall zum ersten Mal untersucht, bei diesem Tier fanden alle Blutentnahmen in einem Stall statt. Die Sauen 370, 384 und 3395 konnten dreimal untersucht werden, Nr. 361 wurde vor der dritten Entnahme verkauft.

Bei Mehrfachuntersuchungen wird deutlich, daß die beiden Mitogene ConA und PHA unterschiedliche Wirkungen auf die jeweiligen Lymphozytenpräparationen ausüben. Bei der Stimulierung mit ConA läßt sich ein vergleichbarer Reaktionsverlauf beobachten.

Mehrfachuntersuchungen (4.2.2.)

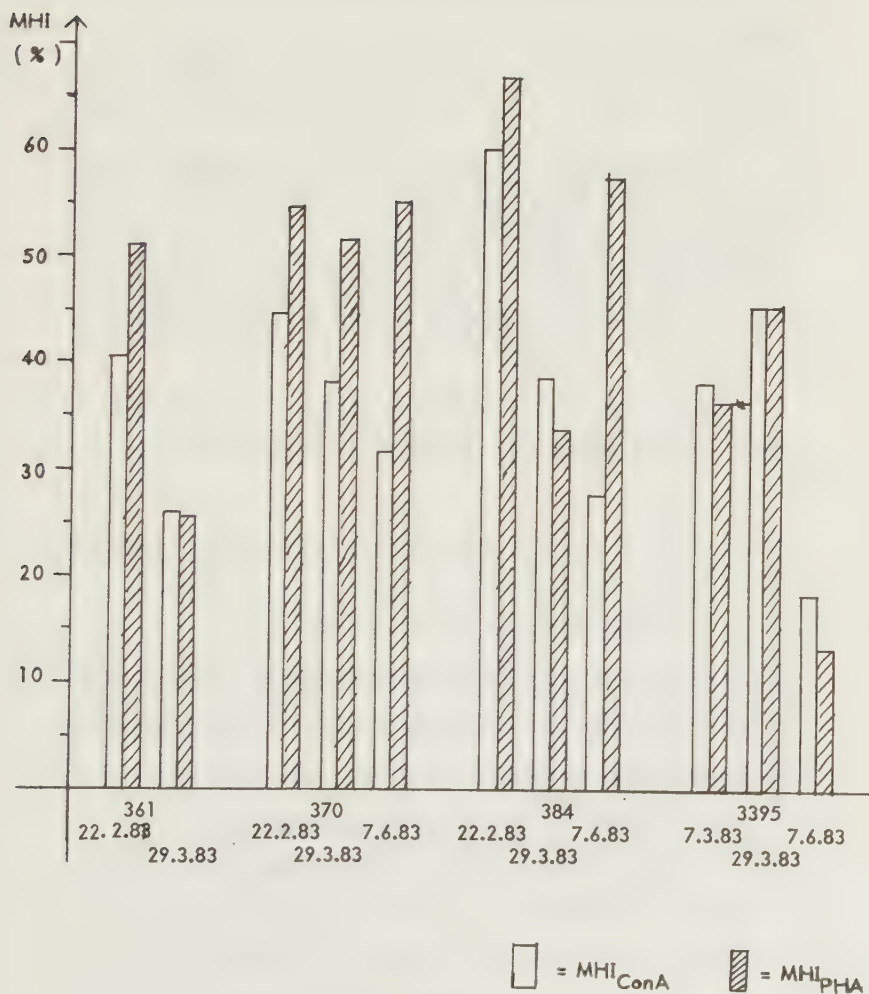
Tab. 11 Die Tiere 361, 370, 384 und 3395 wurden an zwei, bzw. drei Tagen untersucht.

Angegeben werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen der Migrationsstrecken von Kontrolle und Testansätzen, sowie die Migrationshemmungsindices (%MHI) der Mitogene.

Tier Nr.	Datum	Testansatz	Migrationsstrecke			MHI (%)
			$\bar{x}$	$\pm$	s	
361	22.2.83	Kontrolle	34,44	$\pm$	2,42	---
		ConA	20,50	$\pm$	2,39	40,47
		PHA	16,88	$\pm$	2,16	50,98
	29.3.83	Kontrolle	45,25	$\pm$	4,91	---
		ConA	33,50	$\pm$	2,80	25,97
		PHA	33,75	$\pm$	2,21	25,41
370	22.2.83	Kontrolle	27,81	$\pm$	2,69	---
		ConA	15,38	$\pm$	2,47	44,70
		PHA	12,63	$\pm$	2,28	54,58
	29.3.83	Kontrolle	41,90	$\pm$	4,35	---
		ConA	25,81	$\pm$	2,54	38,40
		PHA	20,25	$\pm$	3,00	51,67
	7.6.83	Kontrolle	55,90	$\pm$	3,56	---
		ConA	38,19	$\pm$	3,66	31,68
		PHA	16,88	$\pm$	3,49	55,38
384	22.2.83	Kontrolle	34,00	$\pm$	3,43	---
		ConA	13,44	$\pm$	1,93	60,47
		PHA	11,13	$\pm$	1,86	67,26
	29.3.83	Kontrolle	44,81	$\pm$	4,20	---
		ConA	27,38	$\pm$	2,55	38,90
		PHA	29,69	$\pm$	3,16	33,74
	7.6.83	Kontrolle	57,60	$\pm$	3,59	---
		ConA	41,50	$\pm$	2,80	27,95
		PHA	24,30	$\pm$	2,52	57,81
3395	7.3.83	Kontrolle	51,75	$\pm$	2,86	---
		ConA	32,17	$\pm$	2,72	37,84
		PHA	32,25	$\pm$	3,11	37,68
	29.3.83	Kontrolle	49,92	$\pm$	2,64	---
		ConA	27,10	$\pm$	2,49	45,71
		PHA	27,06	$\pm$	2,93	45,79
	7.6.83	Kontrolle	60,00	$\pm$	2,92	---
		ConA	51,90	$\pm$	1,93	13,50
		PHA	52,30	$\pm$	1,77	12,83

Abb. 8

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Mehrfach-
untersuchungen der Tiere 361, 370, 384 und 3395.
Angabe werden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Migrations-
hemmungsindices für ConA und PHA.



Die Tiere 361, 370, 384 zeigten für ConA während der Stügeperiode (1.Blutentnahme am 22.2.83), eine größere Migrationshemmung und damit bessere Stimulierbarkeit ihrer Lymphozyten, als nach dem Absetzen der Ferkel. (2.Blutentnahme am 29.3.83). Die Hemmungsaktivität für ConA fällt innerhalb des Untersuchungszeitraums signifikant ab. Nr. 3395 bildet hier die Ausnahme, der Hemmungsindex steigt leicht von der ersten zur zweiten Blutentnahme, um dann sehr stark abzufallen, so daß zum Zeitpunkt der dritten Entnahme nahezu keine Migrationshemmung mehr vorhanden ist.

Die vier untersuchten Tiere zeigten für PHA vier unterschiedliche Reaktionen bei drei Testansätzen. (Abb. 8)

Das Tier 361 zeigte am ersten Testtag eine stärkere Hemmung durch PHA, am zweiten war kein Unterschied zwischen den Hemmungsindices von ConA und PHA festzustellen.

Nr. 370 zeigte für ConA im Verlauf der Tests eine abfallende Hemmungsaktivität, der Migrationshemmungsindex für PHA blieb dagegen konstant.

Nr. 384 zeigte beim ersten Test stärkere Hemmung durch PHA, beim zweiten stärkere Hemmung durch ConA, beim dritten Test betrug die Hemmung durch PHA das Doppelte der ConA-Hemmung.

Bei Nr. 3395 wurde an keinem der Untersuchungstage ein signifikanter Unterschied in der Migrationshemmung durch ConA und PHA festgestellt. Diese Unterschiede in der Reaktion auf die beiden Mitogene lassen sich auch durch das Verhältnis MHI_{ConA} zu MHI_{PHA} ausdrücken.

Bei den Tieren 361, 370 und 384 zeigten sich signifikante Unterschiede im Verhältnis der Migrationshemmungsindices zueinander. Diese Tiere stammen aus einem Zuchtprogramm, in dem in der sechsten Generation High-Responder-Typen im DNP*-Antikörperbildungsvermögen selektiert

* Di-nitro-phenol

werden. Möglich ist, daß die Selektion auf Antikörperbildungsvermögen auch einen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit der T-Lymphozyten ausübt hat.

Im Gegensatz dazu bleibt das Verhältnis bei Nr. 3395, einer DL-Sau, die nur zur Zucht verwendet wird, an allen Testtagen konstant bei 1,0.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Variation der Migrationshemmung an verschiedenen Untersuchungstagen sehr groß ist, und daß jeder einzelne Migrationstest die momentane Reaktionsfähigkeit des zellulären Immunsystems eines Tieres widerspiegelt. Damit wird auch deutlich, daß physiologischer Status (Alter, Trächtigkeit, Säugeperiode), Gesundheitszustand und Umwelt des Tieres eine wesentliche Rolle bei der Ausprägung der Lymphozytenreaktion spielen.

4.2.3. Häufigkeitsverteilung der Migrationshemmungsindices (MHI)

Von den 63 untersuchten Schweinen wurde eine Häufigkeitsverteilung der Migrationshemmungsindices von ConA und PHA ermittelt.

Die Einteilung erfolgte in sieben Klassen zu je 10 %, wobei die erste Klasse bei 0 % und die siebente Klasse bei 60 % begann. (Tab. 12, 13, 14, 15, Abb. 9, 10).

Das Ergebnis zeigt eine Normalverteilung der beiden Migrationshemmungsindices, wobei das Maximum des MHI_{PHA} im Bereich 40 - 50 %, das Maximum des MHI_{ConA} im Bereich 30 - 40 % liegt. Das läßt den Schluß zu, daß die Mehrzahl der Versuchstiere durch PHA stärker stimuliert werden, da auch in der siebenten Klasse zwischen 60 und 70 % bei PHA noch viermal mehr Tiere als bei ConA zu finden sind.

In den Tabellen 12 und 13 wird die Verteilung der Migrationshemmungsindices von ConA und PHA in den Familien 1 bis 7 dargestellt.

MHI_{ConA} :

Der Migrationshemmungsindex von ConA (Tab. 12) zeigt bei allen Familien die Häufung in einer Klasse, in der sich bei 6 von 7 Familien auch mindestens ein Elterntier befindet. Die Mehrzahl der Tiere einer Familie liegt innerhalb benachbarter Klassen, d. h. die Streuung ist gering. Beim MHI_{ConA} ist der größte Teil der Versuchstiere, nämlich 39 von 63 Tieren, im Hemmungsbereich unter 40 % zu finden.

Die Familien 1 und 2, Zuchttiere der Deutschen Landrasse, beide mit dem Vater Fiesta, zeigen die höchste Frequenz in der Klasse 30 % MHI_{ConA} .

Bei den Familien 3 und 4, Tiere aus dem DNP-Zuchtprogramm, ist die Konzentration in einer Klasse nicht so deutlich; Familie 3, Elvis x 386, liegt mit der Mehrzahl der Tiere in der Klasse 50 % MHI; ein Tier, Nr. 621, liegt in der Klasse 0 % MHI. Familie 4, Hugo x 384, streut über 5 Klassen, mit 4 von 9 Tieren in der Klasse 30 %. Ein geschlossenes Bild bietet die Familie Nr. 5, Focus x 22, Tiere der Rasse Pietrain, die im unteren Bereich des MHI, mit 7 von 11 Tieren, in der Klasse 20 % MHI liegen. Familie 6, Theo x 134, Kreuzungstiere Wildeber x DE/DL-Sau, streut wie Familie 4 ebenfalls über 5 Klassen, zeigt aber eine deutliche Häufung der Werte in Klasse 30 %, mit 6 von 12 Tieren. Familie 7, 120 x 277, Göttinger Miniaturschweine, liegt im oberen Bereich des MHI. Die höchste Frequenz mit 5 von 7 Tieren hat die Klasse 50 % MHI, die anderen beiden Tiere liegen in den umgebenden Klassen.

MHI_{PHA}:

Die Verteilung des Migrationshemmungsindex von PHA (Tab. 13) zeigt insgesamt größere Streuung innerhalb der Familien. Die Tiere, einschließlich ihrer Eltern, verteilen sich bei 4 von 7 Familien über mehrere Klassen, nur bei den Familien 1 bis 3 sind Hauptklassen vorhanden. Die Mehrzahl, 40 von 63 Tieren, liegen im Bereich über 40 % MHI, wobei allein 8 Tiere in der Klasse der stärksten Hemmung zu finden sind. Bei MHI_{ConA} ist diese Klasse nur mit zwei Tieren besetzt.

Bei den Familien 1 bis 3 sind die Schwerpunkte noch deutlich, während sich bei allen anderen Familien eine Nivellierung in benachbarten Klassen abzeichnet. Auch hier zeigt Familie 4, Hugo x 384, die größte Streuung über 6 Klassen, mit höchstens zwei Tieren pro Klasse. Die Pietrain-Familie 5, verteilt sich über 5 Klassen, mit 5 von 11 Tieren unter 30 % MHI.

Familie 6, Theo x 134, verteilt sich gleichmäßig auf drei benachbarte Klassen zwischen 30 und 50 % MHI, allerdings findet sich ein Tier in der Klasse 0 % MHI (188). Familie 7, 120 x 277, streut ebenfalls über drei Klassen mit jeweils 2 oder drei Tieren.

Vergleicht man die Tabellen 12 und 13 miteinander, erkennt man die Verschiebung des Häufigkeitsmaximums beim MHI_{PHA} zum höheren Hemmungsniveau hin. Auffallend ist dabei besonders die hohe Frequenz der Klasse 60 % MHI. Außerdem ist beim MHI_{PHA} die Verteilung über mehrere Klassen innerhalb einer Familie stärker ausgeprägt und die einzelnen Klassen schwächer besetzt als beim MHI_{ConA} .

Verteilung der Migrationshemmungsindices in verschiedenen Rassen:

1. Deutsche Landrasse

Die Deutsche Landrasse ist durch die Familien 1 bis 4 vertreten. Familie 1 und 2 sind normale Zuchtgruppen, die Familien 3 und 4 gehören dem DNP-Zuchtprogramm an.

Beim MHI_{ConA} haben drei Familien dieser Rasse, Nr. 1, 2 und 4, eine gemeinsame Hauptklasse bei 30 % MHI. 15 von 33 Tieren gehören dieser Klasse an, die übrigen 18 verteilen sich auf sechs verschiedene Klassen. Die Familie 3, Elvis x 386, hat ihre Hauptklasse bei 50 % MHI; fast alle Mitglieder dieser Familie liegen zwischen 40 und 60 % MHI. Hier scheint eine bessere Stimulierbarkeit durch ConA vorzuliegen, als bei den übrigen Familien dieser Rasse.

Beim MHI_{PHA} bilden die Familien 1 bis 3 Hauptklassen bei 40 % MHI (Familie 1) und 50 % MHI (Familien 2 und 3). Hier befinden sich 18 von 33 Tieren zwischen 40 und 60 % MHI. Die übrigen Tiere sind auf vier

Klassen verteilt. Familie 4 bildet keine Hauptklasse für MHI_{PHA} . Die neun Mitglieder dieser Familie verteilen sich über sechs Klassen mit höchstens zwei Tieren pro Klasse. Der Schwerpunkt liegt im Bereich der geringeren Hemmung (6 von 9 Tiere unter 40 %). Diese Reaktionsbreite wird von keiner anderen Familie erreicht und läßt sich möglicherweise mit der Zugehörigkeit zum DNP-Programm (Selektion auf hohe Antikörpertiter gegen DNP in der sechsten Generation) erklären. Auch die Familie 3 gehört diesem Programm an, verhält sich aber beim MHI_{PHA} unauffällig, während sie beim MHI_{ConA} überdurchschnittlich starke Hemmwerte bei 6 von 7 Tieren aufweist.

2. Pietrain

Die Rasse Pietrain wird durch die Familie 5, Focus x 22, repräsentiert, die sich vor allem beim MHI_{ConA} durch niedrige Werte auszeichnet. Die Hauptklasse ist mit 7 von 11 Tieren, einschließlich Vater, besetzt und liegt bei 20 % MHI. Auch beim MHI_{PHA} liegt die Mehrzahl der Familienmitglieder unter 40 % (7 von 11 Tieren) und damit unter dem Durchschnitt.

3. Kreuzungstiere

Familie 6, Theo x 134, eine Kreuzung zwischen einem Wildschweinboar und einer DE/DL-Sau, zeigte bei den Nachkommen eine unterschiedliche Farbverteilung (4 Frischlinge, 3 DL-Ferkel, 3 Pietrain-ähnliche Ferkel) und unterschiedliche Gewichtszunahmen während der Aufzucht. In ihrer Reaktion auf Stimulierung mit ConA verhielten sich die Tiere allerdings wie die Tiere der Deutschen Landrasse, mit einer Hauptklasse bei 30 % MHI. Der MHI_{PHA} zeigt eine Verteilung auf zwei, mit je vier Tieren besetzte Klassen, die restlichen Tiere verteilen sich auf drei weitere Klassen.

4. Göttinger Miniaturschwein

Die Familie 7, 120 x 277, gehört zur Rasse Göttinger Miniaturschwein, einer Kreuzung aus mehreren kleinwüchsigen Schweinerassen. Die Reaktion auf ConA liegt wie bei Familie 3 im oberen Bereich der Hemmung. Die Hauptklasse, mit 5 von 7 Tieren, liegt bei 50 % MHI. Beim MHI_{PHA} verteilen sich die Tiere zwischen 30 und 60 % MHI.

Tab. 12 Häufigkeitsverteilung des Migrationshemmungsindex von ConA innerhalb und zwischen den Familien (4.2.3.)
Die Einteilung erfolgte in sieben Klassen zu je 10 %.
(Muttertiere sind unterstrichen)

0 % -	10 % -	20 % -	30 % -	40 % -	50 % -	60 % -	
	5169	5175	3466 5170 5171 5173 5174 5177 5178	Fiesta 5172 5176			Fam. 1
			3395 5162 5163 5164	Fiesta 5167			Fam. 2
621				620 624	Elvis 386 622 623		Fam. 3
	Hugo	590 592	589 593 594 596	591		<u>384</u>	Fam. 4
		Focus 5408 5409 5411 5412 5413 5414	5406 5410	22 5407			Fam. 5
	Theo	188 123	134 <u>182</u> 183 186 187 189	190 191	184		Fam. 6
				59	120 <u>277</u> 55 56 57	58	Fam. 7

Tab. 13 Häufigkeitsverteilung des Migrationshemmungsindex
von PHA innerhalb und zwischen den Familien.
Die Einteilung erfolgte in sieben Klassen zu je 10 %.
(Muttertiere sind unterstrichen)

0 % -	10 % -	20 % -	30 % -	40 % -	50 % -	60 % -	
		5174		Fiesta 3466 5169 5171 5173 5175 5177 5178	5170 5172	5176	Fam. 1
			<u>3395</u>	Fiesta	5162 5163 5164	5167	Fam. 2
	621			Elvis	386 622 623 624	620	Fam. 3
	589 590	594 596	592 593	Hugo	591	<u>384</u>	Fam. 4
	5408	5409 5410 5411 5413	5412 5414	Focus 22 5406		5407	Fam. 5
188			182 183 187 189	Theo 134 186 123	190 191	184	Fam. 6
			120 59	277 56 57		55 58	Fam. 7

Tab. 14 Häufigkeitsverteilung des Migrationshemmungsindex ConA
bei 63 Tieren.

Klasse :	Anzahl Tiere
0 % -	1
10 % -	3
20 % -	12
30 % -	23
40 % -	12
50 % -	10
60 % -	2

Tab. 15 Häufigkeitsverteilung des Migrationshemmungsindex PHA
bei 63 Tieren.

Klasse :	Anzahl Tiere
0 % -	1
10 % -	4
20 % -	7
30 % -	11
40 % -	20
50 % -	12
60 % -	8

Abb. 9 Häufigkeitsverteilung des Migrationshemmungsindex_{ConA}
bei 63 Tieren, graphische Darstellung.

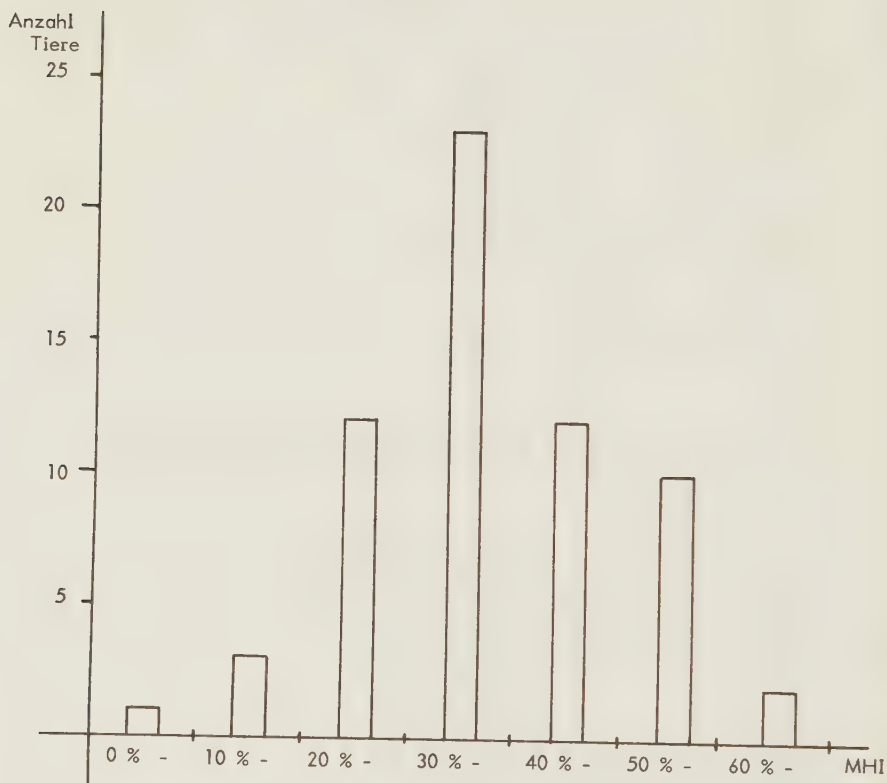
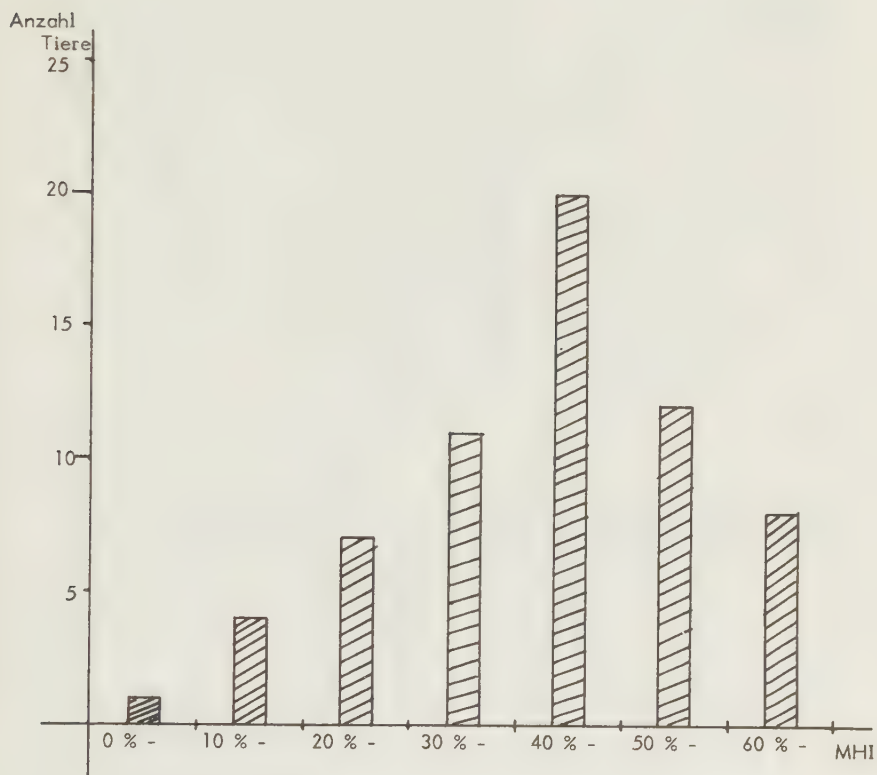


Abb. 10 Häufigkeitsverteilung des Migrationshemmungsindex_{PHA}
bei 63 Tieren, graphische Darstellung



Tab. 16 Verteilung der Absolutwerte der Migrationsstrecken in den Kontrollen innerhalb der Häufigkeitsverteilung des MHI_{ConA}

Skalenteile Migrations- strecke (K.)	Häufigkeitsverteilung MHI _{ConA} (%)						
	0 % -	10 % -	20 % -	30 % -	40 % -	50 % -	60 % -
10 -			594		120		
30 -		Hugo	Focus 5408 5412	593 5164 3466	386		58 384
40 -		5169	590 592 5175 5409 5411 5413 5414	589 596 5163 5173 5174 5177 5410 134 183 189	591 Fiesta 5172 5176 Elvis 620 623 624 184 190 277 55 56		
50 -	621	Theo	123 188	3395 5162 5170 5178 5406 182 186 187	5167 622 22 5407 191 57 59		

Tab. 17 Verteilung der Absolutwerte der Migrationsstrecken in den Kontrollen innerhalb der Häufigkeitsverteilung des MHI_{PHA}

Skalenteile Migrations- strecke (K.)	Häufigkeitsverteilung MHI_{PHA} (%)						
	0 % -	10 % -	20 % -	30 % -	40 % -	50 % -	60 % -
10 -			594	120			
30 -		5408		593 5412 Focus	Hugo 3466	5164 386	384 58
40 -		589 590	596 5174 5409 5410 5411 5413	592 5414 183 189	Fiesta 5169 5173 5175 5177 Elvis 134 277 56	591 5163 5172 623 624 190	5176 620 184 55
50 -	188	621		3395 182 187 59	5171 5178 22 5406 Theo 123 186 57	5162 5170 622 191	5167 5407

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird über einen empfindlichen Test zum Nachweis einer Migrationshemmungsaktivität nach Stimulierung von Lymphozyten durch Mitogene berichtet. In der Literatur werden verschiedene Methoden zum Nachweis dieses Hemmungsfaktors beschrieben. Für die Auswahl der geeigneten Methode waren folgende Kriterien zu beachten:

Schnelle und einfache Durchführbarkeit des Tests mit geringem technischem Aufwand, da ein Einsatz des Testverfahrens in groß angelegten Untersuchungsprogrammen ermöglicht werden soll.

Aus wirtschaftlichen Überlegungen sollte der Verbrauch an Material, wie Testplatten, Medium und Mitogenpräparationen so niedrig wie möglich sein.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Agarose-Mikrodroplet-Methode erfüllt diese Forderungen, wenn bei der Durchführung folgende technischen Voraussetzungen beachtet werden:

Geräte und Zellsuspensionen, die mit der flüssigen Agarose in Berührung kommen, müssen eine Temperatur von 37 °C aufweisen. Die 0,8 % ige Agarose geliert bereits bei Temperaturen unter 36 °C, bei der niedrigeren Konzentration des 0,2 % igen Agarosemediums werden tiefere Temperaturen bis 34 °C toleriert. Die Zellpräparationen müssen daher vor dem Resuspendieren in Agarosemedium mindestens vier Minuten von Zimmertemperatur auf 37 °C erwärmt werden, wie es auch WEESE et al. (1978) vorschlagen. In dieser Zeit befinden sich die Zellen dicht gepackt in einer geringen Menge physiologischer NaCl-Lösung, die nach dem Absaugen im Reagenzglas verblieben war. Beim Erwärmen der Zellen auf

37 °C wird der verlangsamte Stoffwechsel wieder angeregt, so daß eine Schädigung der Zellen durch die eigenen Stoffwechselprodukte erfolgen kann. Deshalb darf diese Zeitspanne von höchstens fünf Minuten bis zum Einbringen der Zellen in das Agarosemedium nicht überschritten werden. In diesem Medium wird durch den vorhandenen HEPES-Puffer eine pH-Konstanz gewährleistet.

Beim Einpipettieren der Zellsuspension in die erwärmten Testplatten muß ebenfalls eine Temperatur von 37 °C eingehalten werden, bis alle zwölf Agarosetropfen pro Tier eingebracht sind. Die Zellsuspension muß dabei ständig durchmischt werden, um eine gleichmäßige Verteilung von Lymphozyten und Granulozyten zu gewährleisten.

Nachdem eine Testplatte einpipettiert ist, wird sie für fünf Minuten bei 4 °C gelagert. Auch diese Zeit sollte nicht überschritten werden, um ein Austrocknen der Zelltropfen zu verhindern. Im Anschluß an das Gelieren der Agarosetropfen wird das Testmedium zugesetzt, das nur Zimmertemperatur aufweisen sollte, damit die Temperaturunterschiede, denen die Zellen ausgesetzt sind, nicht zu groß werden.

Beim Übersichten mit Medium muß trotz der verbesserten Haftung durch den Agaroseträger sehr vorsichtig vorgegangen werden, um ein Ablösen der Tropfen zu vermeiden. Abgeschwemmte Zelltropfen lassen sich nicht mehr auswerten, da die Zellen zunächst ins Medium auswandern und sich dann auf der gesamten Bodenfläche der Schale verteilen.

Die Agarose-Mikrodroplet-Methode wird nicht zuletzt wegen ihres geringen Materialverbrauchs empfohlen. (HAHN et al. (1976), FAHLBUSCH und DORNBERGER (1979).

Pro Tier werden bei vier Parallelansätzen insgesamt 6 ml Medium benötigt, zusätzlich nicht mehr als 1 ml Agarosemedium. Auch die Mitogenmenge ist entsprechend gering.

Vor Testbeginn wurden alle verwendeten Medien in größeren Mengen zubereitet und portionsweise eingefroren. Zum Test wurde dann die entsprechende Menge bereitgestellt und verwendet. Bereits aufgetaute, aber nicht verbrauchte Portionen werden verworfen.

Eine der wichtigsten Bedingungen für einen Test mit lebenden Zellen ist die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts während der Inkubation, trotz der anfallenden Stoffwechselmetaboliten.(KRISTENSEN et al. (1982), BERGSTRAND (1979). Ohne ausreichende Pufferung kommt es zur Übersäuerung des Nährmediums, die den Tod der Zellen zur Folge haben kann.(CLAUSEN (1973), SCHLAAK (1975), FAHLBUSCH und DORNBERGER (1979). Aus diesem Grund wurden alle verwendeten Medien mit HEPES-Puffer versetzt und auf einen pH von 7,3 eingestellt. Diese Einstellung kann erst nach Zugabe des benötigten Serums erfolgen, da dieses den pH-Wert um 0,2 - 0,4 erhöht.(HAUNER (1984).

Die Zugabe von Serum zum Medium hat sich in einigen Vorversuchen für eine gut auswertbare Migration als unbedingt notwendig erwiesen. GUTEKUNST (1978) verwendet beim Schwein 20 % hitzeinaktiviertes Serum. Mit diesem Prozentsatz von 20 % Kaninchenserum waren auch in diesem Test die besten Resultate in den Vorversuchen zu erzielen.

Die Erhitzung des Serums auf 56 °C während 30 Minuten soll eine Beeinflussung des Migrationstests durch im frischen Serum möglicherweise vorhandene Faktoren verhindern. FOX et al.(1974) fanden bei Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS) sowohl stimulierende, als auch hemmende Faktoren im Serum. BAER et al.(1978) wiesen den Einfluß verschiedener heterologer Seren auf die Migration von Makrophagen nach und fanden eine Aufhebung dieser spontanen Migrationshemmung nach Hitzeinaktivierung der jeweiligen Seren.

Die Zugabe von 20 % hitzeinaktiviertem gepooltem Kaninchenserum zum Medium bewirkt eine gleichmässige und weite Wanderung der Schweinegranulozyten.

Durch die Verwendung der gleichen Serumcharge während der gesamten Versuchsreihe waren die Testbedingungen auch in diesem Punkt für alle Tiere gleich. Dadurch wurde eine weitere Variationsmöglichkeit der Methode ausgeschaltet.

Schwieriger zu vermeiden sind Unterschiede in der subjektiven Beurteilung der Migrationsstrecken bei der mikroskopischen Auswertung der Testansätze. Da die Anzahl der auswandernden Zellen individuellen Schwankungen unterliegt und einige Tiere zwar weite Wanderungsstrecken, aber nur geringe Zelldichte im Migrationshof aufweisen, treten Schwierigkeiten beim Ablesen der oft unklaren äußeren Begrenzung der Migrationshöfe auf. Diese Grenze wird als Übergang von hoher zu geringerer Zelldichte definiert und kann bei Tieren mit geringen Zellzahlen nur sehr schwer festgelegt werden. Eine Häufung von Werten in einem bestimmten Migrationsbereich kann durch den vierfachen Testansatz festgestellt werden.

Die Verwendung von vier Parallelansätzen erwies sich bereits im Verlauf der Vorversuche als notwendige Minimalanzahl, da sich auch bei großer Sorgfalt immer wieder Agarosetropfen ablösen können und somit kein auswertbarer Migrationshof vorhanden ist. Bei vier Ansätzen waren jedoch immer mindestens zwei Migrationshöfe auswertbar, so daß zur Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung wenigstens acht Werte zur Verfügung standen.

Diese Mittelwerte der Migrationsstrecken von Mitogen- und Kontrollansätzen wurden bei allen Tieren zur Berechnung des Migrationshemmungsindex (MHI) verwendet, der in der vorliegenden Ergebnissen als Maß für den Stimulations-

grad der Lymphozyten eingesetzt wurde.

Der direkte Vergleich der Migrationshemmungsindices verschiedener Tiere wurde durch die Verwendung konstanter Zellzahlen von Lymphozyten und Granulozyten (ASHKENAZI et al.(1978) ermöglicht.

Die Ergebnisse dieses Vergleichs zeigten, daß die Migrationshemmungsindices für die Mitogene ConA und PHA zwischen den untersuchten Tieren große Variationen aufwiesen. Auch bei der Ausprägung des MHI zwischen den Mitogenen waren diese Unterschiede festzustellen.(Tab.1-7, 12,13)

Die Häufigkeitsverteilung (Tab.14,15) der Migrationshemmungsindices der Mitogene innerhalb des gesamten Tiermaterials läßt die Tendenz zur stärkeren Hemmung durch PHA bei der Mehrzahl der Versuchstiere erkennen. 63 % der Tiere liegen über 40 % MHI_{PHA} . Beim MHI_{ConA} liegen nur 21 % der Tiere über diesem Wert.

Die Ursache dieser unterschiedlichen Hemmungsaktivitäten könnte in einer unterschiedlichen Verteilung von Rezeptoren für die beiden Mitogene innerhalb der untersuchten Tiergruppe zu suchen sein. SCHMID und Cwik (1972, 1974) fanden in der Hämagglutination Rezeptoren für PHA und ConA auf isolierten Schweinelymphozyten und Schweinegranulozyten. Für den PHA-Rezeptor auf Lymphozyten ergab sich eine Frequenz von 70 %, für PHA-Rezeptoren auf Granulozyten eine Frequenz von 30 %. 18 % der untersuchten Schweine besaßen Rezeptoren auf Lymphozyten und Granulozyten. 6 % der Tiere besaßen keine nachweisbaren Rezeptoren.

Diese Verteilung der PHA-Rezeptoren entspricht in etwa der Häufigkeitsverteilung des MHI_{PHA} in der hier untersuchten Tiergruppe . Unterhalb der 20 % -Grenze lagen 5 Schweine, entsprechend 8 % der Tiere. Zieht man die Rezeptorenverteilung in Betracht, könnte es sich bei diesen 8 % um Tiere handeln, die weder auf Lymphozyten noch auf Granulozyten

Rezeptoren für PHA aufweisen. die Tiere mit den stärksten Hemmungsindices könnten dementsprechend Rezeptoren auf beiden Zellarten tragen. Gegen diesen Erklärungsversuch spricht das Ergebnis der Mehrfachuntersuchungen (Tab.11,Abb.8) von verschiedenen Tieren.

Vier Muttertiere wurden in größeren Zeitabständen zwei- bzw. dreimal untersucht. Bei allen Tieren waren Variationen zwischen den einzelnen Testergebnissen vorhanden, sowohl in den absoluten Migrationsstrecken der Kontrollen, d.h. in der Funktionsfähigkeit der Granulozyten, als auch in den Hemmungsindices von ConA und PHA, der Lymphozytenreaktion. Das Tier 3395 zeigte für den MHI_{PHA} eine Variationsbreite von 33 % MHI, wobei am letzten Untersuchungstag eine äußerst geringe Hemmung (unter 20 %) bei beiden Mitogenen vorlag. Diese Differenzen zwischen verschiedenen Untersuchungen eines Tieres deuten darauf hin, daß es sich bei der Lymphokinfreisetzung nach Mitogenstimulierung um eine Reaktion handelt, die den Status des Immunsystems am jeweiligen Untersuchungstag widerspiegelt.

Auf große Variationen bei Mehrfachuntersuchungen im Lymphozytenstimulationstest verwiesen LARSEN (1979) beim Schwein, und ENTRINGER (1980) beim Rind. Geringere Variationen fanden HAHN et al.(1976) beim Migrationshemmungstest mit menschlichen Leukozyten.

Die unterschiedlichen Ergebnisse an verschiedenen Untersuchungstagen, die bei den erwachsenen Tieren mit aktivem Immunsystem eine Variabilität bis zu 35 % zeigten, lassen den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Lymphozytenreaktion erkennen. Geburtsstress, Stallwechsel, Parasitenbehandlung, erneute Trächtigkeit und saisonale Einflüsse (JENSEN und CHRISTENSEN (1981 a) sind Ereignisse, die die Reaktion der Lymphozyten vielleicht im Sinne einer permanenten Stimulierung des Immunsystems, beeinflussen können.

Die Reaktionsfähigkeit junger Schweine, die in den ersten Lebenstagen ebenfalls starken Belastungen ausgesetzt sind, wurde von HOFFMANN und URBANECK (1981) untersucht. Sie fanden beim Ferkel durch Mehrfachuntersuchungen, vom Zeitpunkt der Geburt bis zum 35. Tag post partum, eine vollausgebildete Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten gegenüber PHA vom 8. Lebenstag an.

Das Immunsystem der, in der vorliegenden Arbeit untersuchten, sechs Wochen alten Ferkel kann demzufolge als ausgereiftes System betrachtet werden, so daß ein Einfluß des Alters auf die Ausprägung der Migrationshemmungsindices innerhalb der Familien ausgeschlossen werden kann. (Tab. 12, 13)

Die Häufigkeitsverteilung des MHI (Tab. 12, 13) zeigt besonders beim MHI_{ConA} deutliche Schwerpunkte bei allen Familien. Bei 6 von 7 Familien liegt in diesen Schwerpunktklassen mindestens ein Elterntier. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Reaktionsstärke für das Mitogen ConA genetisch determiniert ist.

Beim MHI_{PHA} (Tab. 13) war eine derartige Verteilung nicht erkennbar. Zur Untersuchung einer genetischen Determinierung der quantitativen Merkmalsbildung für ConA und PHA, über die Auswertung der Migrationshemmungsindices, sind weitere umfangreiche Familienuntersuchungen unbedingt erforderlich. Hinweise auf eine polygenetische Kontrolle der Mitogenantwort finden sich bei ROZING und VAESSEN (1979).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, daß eine Beurteilung der Reaktionsbreite der Lymphozytenantwort eines Tieres auf die unspezifische Stimulierung des Immunsystems mit Mitogenen nur über eine definierte und gezielte Belastung des Immunsystems erfolgen kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Untersuchungsmethode zum Nachweis eines Lymphozyten-Mediators beim Schwein wird beschrieben.

Bei dieser Methode handelt es sich um ein kombiniertes Verfahren, in dem Lymphozyten durch Mitogene stimuliert und die dabei gebildeten Lymphokine im Granulozyten-Migrationstest geprüft wurden.

Zur Stimulierung der Lymphozyten wurden die Mitogene Concanavalin A (ConA) und Phytohämagglutinin (PHA) im Vergleich eingesetzt.

Die verwendete Agarose-Mikrodroplet-Methode diente zum Nachweis der Mediatoren gegenüber autologen Granulozyten als Zielzellen im Migrationstest.

Der entscheidende Vorteil der kombinierten Methode wird darin gesehen, daß bei kurzer Inkubationszeit die Stimulierbarkeit der Lymphozyten über eine Lymphokinbildung gemessen werden kann.

Schweinegranulozyten als Zielzellen des Migrationstests erwiesen sich in Bezug auf ihre Gewinnung in ausreichender Menge und auf ihre Funktionsstabilität nach Isolierung als sehr vorteilhaft.

Nach Stimulierung der Lymphozyten wurde ein Faktor nachgewiesen, der die Migration autologer Granulozyten hemmt.

An Hand einer Häufigkeitsverteilung der Migrationshemmungsindices zeichnet sich bei der Mehrzahl der untersuchten Tiere eine stärkere Hemmung nach Stimulierung durch PHA ab.

Die Konzentration in bestimmten Hemmungsklassen innerhalb und zwischen den untersuchten Familien, ist beim MHI_{ConA} deutlicher sichtbar, als beim MHI_{PHA} .

Bei Mehrfachuntersuchungen einzelner Tiere an verschiedenen Tagen wurden deutlich unterschiedliche Hemmungswerte ermittelt, die dafür sprechen,

daß die Freisetzung des Migrationshemmungsfaktors den augenblicklichen Funktionsstatus des zellulären Immunsystems anzeigt.

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen kann abgeleitet werden, daß das im Migrationshemmungstest erfassbare individuelle Reaktionsvermögen bei der Beurteilung der Funktion des zellulären Immunsystems besonders zu beachten ist.

Die Untersuchung des individuellen Reaktionsvermögens in größeren Schweinepopulationen unter definierter Belastung kann weiteren Aufschluß über zelluläre Abwehrmechanismen geben.

7. SUMMARY

Porcine lymphocyte mediator activity assayed in a granulocyte migration inhibition test.

An assay for a pig lymphocyte mediator is described .

This method is a combined procedure in which lymphocytes are stimulated with mitogens , and the produced lymphokines are examined in the granulocyte migration test.

Lectins ConA and PHA were employed for comparative studies.

Mediators of cellular immunity were tested in the agarose-microdroplet-assay against autologous granulocytes in the migration test.

The advantage of the combined method lies in the short incubation time necessary for lymphocyte stimulation to induce lymphokine production. Porcine granulocytes proved to be excellent target cells in respect to their functional stability after isolation. Granulocytes of the pig are readily available in sufficient numbers.

After stimulation of porcine lymphocytes a mediator was released having an inhibitory effect on the migration of autologous granulocytes.

The animals are grouped according to their migration-inhibition indices. The results show a higher frequency of pigs in classes of strong inhibition after stimulation with PHA.

Concentrations within one main-class of inhibition within and between complete families are more frequent in MHI_{ConA} than in MHI_{PHA} .

Lymphocytes of animals repeatedly challenged with lectins on different days show a varying ability to produce mediators influencing the migration of granulocytes.

This observation obviates the transient functional status of the cellular immune system.

The obtained results lead to the conclusion that momentary and individual capacities of the cellular immune system are to be considered in an assessment of immune responsiveness.

Defined immunological challenge in vivo on a larger population of pigs could give useful information on mechanisms of cellular immunity.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ADELMAN, N., HASSON, M., MASIH, N., COHEN, M.C. :
Correlation between agarose-microdroplet and capillary tube
procedures as assays for migration inhibition of target cells
JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 34 (1980) 235-242
- AGRUP, G., KÄLLEN, B., NILSSON, O. :
Two-step leucocyte migration in agarose technique
INT. ARCHS. ALLERGY APPL. IMMUN. 63 (1980) 105-112
- ANDERSSON, J., EDELMAN, G.M., MÖLLER, G., SJÖBERG, O. :
Activation of B lymphocytes by locally concentrated
concanavalin A
EUR. J. IMMUNOL. 2 (1972) 233-235
- ANSFIELD, M.J., SHALABY, M.R., KALTREIDER, H.B. :
An indirect assay for canine leucocyte migration inhibitory factor
(LIF): demonstration of its species specificity
JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 34 (1980) 43-48
- ASHKENAZI, A., HANDZEL, Z.T., IDAR, D., OFARIM, M., LEVIN, S. :
An in-vitro immunological assay for diagnosis of Coeliac Disease
THE LANCET (1978) 627-629
- ASHKENAZI, A., LEVIN, S., IDAR, D., OR, A., ROSENBERG, I., HANDZEL, Z.T. :
In vitro cell-mediated assay for cow's milk allergy
PEDIATRICS 66 (1980) 399-402
- ASTOR, S.H., SPITLER, L.E., FRICK, O.L., FUDENBERG, H.H. :
Human leucocyte migration inhibition in agarose using four antigens:
correlation with skin reactivity
J. IMMUNOL. 110 (1973) 1174-1179
- AVRILOMMI, H., RÄSÄNEN, L. :
Spontaneous lymphokine synthesis by human blood mononuclear cells
NATURE 257 (1975) 144-146

- BAER, R., VOGT, K., LAZARY, S., GECZY, C., DE WECK, A.L. :
Lymphokines. VI. Factors in human and other heterologous sera
inhibiting the migration of Guinea Pig macrophages
Z. IMMUN.- FORSCH. 155 (1978) 130-143
- BELSHEIM, J. :
A modified leucocyte migration under agarose technique (LMAT)
ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND. SECT. C 89 (1981) 167-174
- BENDTZEN, K. :
Inhibition of human leucocyte migration inhibitory factor (LIF)
by α -L-Fucose
ACTA ALLERGOLOGICA 30 (1975) 327-338
- BENDTZEN, K. :
Some physicochemical properties of human leucocyte migration
inhibitory factor (LIF)
ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND. SECT. C 84 (1976) 471-476
- BENNETT, B., BLOOM, B.R. :
Studies on the migration inhibitory factor associated with
delayed-type hypersensitivity: cytodynamics and specificity
TRANSPLANTATION 5 (1967)
- BERGMAN, R. :
Cell-mediated immune response in pigs persistently infected with
a *Mycobacterium avium* strain
RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE 28 (1980) 315-320
- BERGSTRAND, H. :
Review article
Lymphocyte-derived factors affecting cell migration in vitro
ALLERGY 34 (1979) 69-96
- BERGSTRAND, H., KÄLLEN, B. :
On the statistical evaluation of the macrophage migration
inhibition assay
SCAND. J. IMMUNOL. 2 (1973) 173-187

- BERTOTTO, A., CAPRINO, D., VACCARO, R., SONAGLIA, F. :
Serum migration-inhibitory activity in children with acute
Infectious Mononucleosis
CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY 19 (1981) 314-318
- BERTRAMS, J., RITTNER, CH. :
Der HLA- Komplex
Immungenetische Steuerzentrale des Menschen
DTSCH. MED. WSCHR. 106 (1981) 952-958
- BLOOM, B.R., BENNETT, B. :
Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type
hypersensitivity
SCIENCE 153 (1966) 80-82
- BOLLWAHN, W., VOLLMERHAUS, B., HEINRITZI, K., ROOS, H. :
Erneut - Zur Blutentnahme aus der Jugularvene beim größeren Schwein
PRAKT. TIERARZT 63 (1982) 1037-1042
- BRANDO, B., CIVATI, G., NOVA, M.L., BOCCHI, A., MINETTI, L. :
A new method for determining native T-suppressor cell function
in vitro
TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 15, 1 (1983) 776-779
- BUSCHMANN, H., ENTRINGER, G., MEYER, J. :
Untersuchungen zur Variation der mitogeninduzierten Stimulation
von Rinderlymphozyten
ZÜCHTUNGSKUNDE 52,2 (1980) 107-113
- BUSCHMANN, H., PAWLAS, S. :
Vergleichende Untersuchungen an den Lymphozyten-Subpopulationen
von Rind und Schwein
ZBL. VET. MED. B 27 (1980) 190-206
- CARPENTER, R.R., BARSALES, P.B., GANCHAN, R.P. :
Antigen-induced inhibition of cell migration in agar gel, plasma clot
and liquid media
JOURNAL OF RETICULOENDOTHELIAL SOCIETY 5 (1968) 472-483

CARUSO, C., BELLINA, L. :

B 8, DR 3 antigens and production of a human leucocyte migration inhibitory factor (LIF) by mononuclear cells stimulated with concanavalinA (ConA)

TISSUE ANTIGENS 22 (1982) 167-169

CLAUSEN, J.E. :

Tuberculin induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium

ACTA ALLERGOLOGICA (1971) 56-80

CLAUSEN, J.E. :

Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from mixed human lymphocyte cultures

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 108, 2 (1972) 453-459

CLAUSEN, J.E. :

Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from tuberculin-stimulated cultures of human mononuclear leucocytes demonstrated by two-step MIF agarose assay

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 110, 2 (1973 a) 546- 551

CLAUSEN, J.E. :

Leucocyte migration agarose technique: some technical details

ACTA ALLERGOLOGICA 28 (1973 b) 351-364

DAMLE, N.K., GUPTA, S. :

Heterogeneity of concanavalinA-induced suppressor T cells in man defined with monoclonal antibodies

CLIN. EXP. IMMUNOL. 48 (1982) 581-588

DAVID, J.R., AL-ASKARI, S., LAWRENCE, H.S., THOMAS, L.:

Delayed hypersensitivity in vitro

I. The specificity of inhibition of cell migration by antigens

J. IMMUN. 93 (1964) 264-272

DOOLEY, D., TAKAHASHI, T. :

The effect of osmotic stress on the function of the human granulocyte

HEMATOL. 9,7, (1981) 731-741

DUMONDE, D.C., WOLSTENCROFT, R.A., PANAYI, G.S., MATTHEW, M.,
MORLEY, J., HOWSON, W.T. :

"Lymphokines" : Non-antibody mediators of cellular immunity generated
by lymphocyte activation
NATURE 224 (1969) 38-42

DUTTON, R.W., HUNTER, P. :

The effects of mitogen-stimulated T cells on the response of B cell
to antigen and the mechanism of T cell stimulation of the B cell response
in CELLULAR SELECTION AND REGULATION IN THE IMMUNE RESPONSE
ed. by EDELMAN, G.M., Raven Press, New York, (1974)

EMMRICH, F., FELBER, F. :

Leukozytenmigrationstest unter Agarose (LMTA)
IMMUNOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN
von FRIEMEL, H. (1980) 549-556

ENTRINGER, G. :

Untersuchungen zur Variation der mitogeninduzierten Stimulation
von Rinderlymphozyten
DISSERTATION MÜNCHEN (1980)

FAHLBUSCH, B., DORNBERGER, G. :

Studies of assay conditions for macrophage migration from an
agarose droplet
ACTA BIOL. MED. GERM. 38 (1979) 1453-1460

FEDERLIN, K., MAINI, R.N., RUSSELL, A.S., DUMONDE, D.C. :

A micro-method for peripheral leucocyte migration in tuberculin
sensitivity
J. CLIN. PATH. 24 (1971) 533-536

FENTON, E.L., TAYLOR, M.M. :

A modified quantitative assay for substances that inhibit the migration
of macrophages and other leucocytes: the use of concanavalinA as a
reference reagent
JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 7 (1975) 123-142

- FILER, D., PATTISON, J.D., ANDERSON, W.G., GETTINBY, G., ANDERSON, M.:
Methods
Reproducibility of leucocyte migration from agarose microdroplets
J. CLIN. LAB. IMMUNOL. 5 (1981) 185-189
- FLANAGAN, T.D., YOSHIDA, T., COHEN, S. :
Production of macrophage migration inhibition factors by
virus-infected cell-cultures
INFECTION AND IMMUNITY 8,2 (1973) 145-150
- FORD, W.L. :
The preparation and labelling of lymphocytes
in HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY
ed. by WEIR, D.M. 2 (1978)
- FOX, R.A., DOUGLAS, G.S., FELDMAN, J.D. :
Migration inhibition factor (MIF) and migration stimulation
factor (MSF) in fetal calf serum
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 112, 5 (1974) 1861-1866
- GAINES, J.D., ARANJO, F.G., KRAHENBUHL, J.L., REMINGTON, J.S. :
Simplified in vitro method for measuring delayed hypersensitivity
to latent intracellular infection in man (Toxoplasmosis)
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 109,1 (1972) 179-182
- GATTRINGER, C., HUBER, H. :
Immunologischer Nachweis und In-vitro- Aktivität von Suppressorzellen
WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT 5 (1983) 138-144
- GEORGE, M., VAUGHAN, J.H. :
In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity
PROC. SOC. EXP. BIOL. 111 (1962) 514-521
- GILL III, T.J., KUNZ, H.W. :
The role of regional differences in the Major Histocompatibility Complex
in the production during pregnancy of a serum factor inhibiting
macrophage migration
JOURNAL OF IMMUNOGENETICS 7 (1980) 157-165

GILLIS, S., SMITH, K.A., WATSON, J. :

Biochemical characterization of lymphocyte regulatory molecules

II. Purification of a class of rat and human lymphokines

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 124, 4 (1980) 1954-1962

GLASSER, L., FIEDERLEIN, R.L. :

Neutrophil migration under agarose

Quantitation and variables

AM. J. CLIN. PATH. 72 (1979) 956-962

GREAVES, M.F., BAUMINGER, S., JANOSSY, G. :

Lymphocyte activation

III. Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations

CLIN. EXP. IMMUNOL. 10 (1972) 537-554

GUTEKUNST, D.E. :

Cellular immunity shown in Pseudorabies Virus-infected pigs

by leucocyte migration-inhibition procedure

AM. J. VET. RES. 40, 1 (1978) 66-68

HAHN, T., LEVIN, S., HANDZEL, Z.T. :

Leucocyte migration inhibiting factor (LIF) production by lymphocytes

of normal childrens, newborns and children with immune deficiency

CLIN. EXP. IMMUNOL. 24 (1976) 448-454

HARRINGTON, J.T., STASTNY, P. :

Macrophage migration from an agarose droplet: development of a
micromethod for assay of delayed hypersensitivity

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 110, 3 (1973) 752-759

HAUNER, G. :

Über den Nachweis von Leukozyten-Mediatoren im Serum von

experimentell mit Trypanosomen infizierten Rindern

DISSERTATION MÜNCHEN (1984)

HENRICH, D. :

Einfluß von Gram-positiven Bakterienzellwandsubstanzen auf die

zytotoxischen Eigenschaften und die Stimulierbarkeit von Lymphozyten

DIPLOMARBEIT BIOLOGIE MÜNCHEN (1979)

- HERSCOWITZ, H.B., SAKANE, T., STEINBERG, A.D., GREEN, J. :
Heterogeneity of human suppressor cells induced by concanavalinA
as determined in simultaneous assays of immune function
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 124,3, (1980) 1403-1410
- HOFFMAN, P.M., SPITLER, L.E., HSU, M., FUDENBERG, H.H. :
Leukocyte migration inhibition in agarose
CELLULAR IMMUNOLOGY 18 (1975) 21-30
- HOFFMAN, P.M., HANES, D.M., HORSMANHEIMO, M., FUDENBERG, H.H. :
Leucocyte migration in Guinea pigs
II. Partial characterization of a leucocyte migration inhibitory factor
distinct from macrophage migration inhibitory factor
CELLULAR IMMUNOLOGY 30 (1977) 92-99
- HOFFMANN, A., URBANECK, D. :
Zur Entwicklung der zellvermittelten Immunität beim Ferkel
MH. VET. MED. 36 (1981) 453-458
- DEN HOLLANDER, F.C., VAN LIESHOUT, J.I., SCHUURS, A.H.W.M. :
Statistically designed assay of migration-inhibitory activity
in lymphokine preparations
IMMUNOPHARMACOLOGY 3, 2 (1981) 161-178
- JANOSSY, G., GREAVES, M.F. :
Lymphocyte activation
I. Response of 'T' and 'B' lymphocytes to phytomitogens
CLIN. EXP. IMMUNOL. 9, (1969) 483-487
- JANOSSY, G., GREAVES, M.F. :
Lymphocyte activation
II. Discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by
phytomitogens and heterologous antilymphocyte sera
CLI. EXP. IMMUNOL. 10 (1972) 525-536
- JENSEN, P.T., CHRISTENSEN, K. :
In vitro evaluation of porcine lymphocyte response to phytohaem-
agglutinin using a modified "whole blood" technique
VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY 2(1981a) 121-132
- JENSEN, P.T., CHRISTENSEN, K. :
Genetic studies on the in vitro PHA-transformation of porcine
blood lymphocytes
VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY 2(1981b) 133-143

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M.M. :

Determination of the migration area in macrophage migration inhibition assay: a comparison of the whole with the dense part of the fan

JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 5 (1974) 83-90

KALLENBERG, C.G.M., DE GAST, G.C., THE, T.H. :

Suppression of DNA synthesis by ConA-activated human lymphocytes: role of monocytes in ConA-induced suppression

CLIN. EXP. IMMUNOL. 41 (1980) 583-590

KIPP, D.E., ASKONAS, B.A. :

Receptors for T-cell growth

NATURE 296 (1982) 707

KRISTENSEN, F., KRISTENSEN, B., VANDELDE, M., HIGGINS, R.J.,

DE WECK, A.L. :

Analysis of the in vitro activation and proliferation process in lymphocytes deriving from canine thymus and mesenteric lymphnode

VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY 2(1981)579-590

KRISTENSEN, F., KRISTENSEN, B., LAZARY, S. :

The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology

VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY 3(1982)203-277

KUMAR, S.P., MUSCOPLAT, CH.C., THOEN, CH., JOHNSON, D.W. :

Potentiation of lymphocyte mitogenic responses to concanavalinA by antigen-activated peripheral blood monocytes

AM. J. VET. RES. 40 (1979) 684-687

LARSEN, H.J. :

A whole blood method for measuring mitogen-induced transformation of sheep lymphocytes

RES. IN VET. SCIENCE 26 (1979) 334-338

LOHRMANN, H.P., NOVIKOV, L., GRAW, R.G.jun. :

Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in the mixed leucocyte culture

NATURE 250 (1974) 144-145

LOOR, F.,

Binding and redistribution of lectins on lymphocyte membrane
EUR. J. IMMUNOL. 4 (1974) 210-220

McCOY, J.L., DEAN, J., HERBERMAN, R.B. :

Human cell mediated immunity to tuberculin as assayed by the
agarose micro-droplet leucocyte migration inhibition technique:
comparison with the capillary tube assay
JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 15 (1977) 355-371

MUSCOPLAT, C., KIM, Y.B. :

Enhancement of phytohemagglutinin and concanavalinA
Responses of splenic lymphocytes by adherent cell removal
AM. J. VET. RES. 38, 6 (1977) 799-801

NATH, I., POULTER, L.W., TURK, J.L. :

Effect of lymphocyte mediators on macrophage in vitro
A correlation of morphological and cytochemical changes
CLIN. EXP. IMMUNOL. 13 (1973) 455-466

NATHAN, C.F., KARNOVSKY, M.L., DAVID, J.R. :

Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes
J. EXP. MED. 133 (1971) 1356-1373

NETA, R. :

Mechanisms in the in vivo release of lymphokines
II. Regulation of in vivo release of type II interferon $IFN\gamma'$
CELLULAR IMMUNOLOGY 60 (1981) 100-108

NETA, R., SALVIN, S.B. :

Mechanisms in the in vivo release of lymphokines
Relationship of high and low responsiveness to other parameters
of the immune response
INFECTION AND IMMUNITY 34, 1 (1981) 160-165

NETA, R., SALVIN, S.B., SABAAWI, M. :

Mechanisms in the in vivo release of lymphokines
I. Comparative kinetics in the release of six lymphokines
in inbred strains of mice
CELLULAR IMMUNOLOGY 64 (1981) 203-219

NETA, R., SALVIN, S.B., SHREFFLER, D.C. :

Mechanisms in the in vivo release of lymphokines

VI. Studies with mice congenic at the H-2 region

TRANSPLANTATION 33, 1 (1982) 102-103

NEWLIN, C.M., GASSER, D.L. :

Genetic control of the in vitro response of rat peripheral blood

lymphocytes to phytohemagglutinin and concanavalin A

Journal of Immunology 110, 3 (1973) 622-628

OTTO, F. :

Granulozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere

BLUT 21 (1970) 290-294

OTTO, F., SCHMID, D.O. :

Lymphozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere

BLUT 21 (1970) 118-122

OTZ, U., LAZARY, S., SCHOOK, L.B., DE WECK, A.L. :

Characterization of lymphokines from human mononuclear
cell cultures

aus BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LYMPHOKINES

Academic Press (1980)

PALACIOS, R. :

Mechanism of T cell activation:

Role and functional relationship of HLA-DR antigens and interleukins

IMMUNOLOGICAL REV. 63 (1982) 73-110

PATTISON, J.D., FILER, D., ANDERSON, W.G., GETTINBY, G., ANDERSON, J.M. :

Methods

Variability of in vitro migration of human leucocytes

J. CLIN. LAB. IMMUNOL. 5 (1981) 191-194

PICK, E., BROSTOFF, J., KREJCI, J., TURK, J.L. :

Interaction between "sensitized lymphocytes" and antigen in vitro

II. Mitogen-induced release of skin reactive and macrophage
migration inhibitory factors

CELLULAR IMMUNOLOGY 1 (1970) 92-109

PICK, E., TURK, J.L. :

Review

The biological activities of soluble lymphocyte products

CLIN. EXP. IMMUNOL. 10 (1972) 1-23

RAFFAEL, C., SELL, S. :

The relationship between endocytosis of concanavalinA and
phytohaemagglutinin receptors and blast transformation, and
direct identification of individual rabbit lymphocytes reactive
to both mitogens

J. CELL. SCI. 56 (1982) 141-156

ROCKLIN, R.E. :

Products of activated lymphocytes: leucocyte inhibitory factor
(LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF)

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 112, 4 (1974) 1461-1466

ROCKLIN, R.E. :

Partial characterization of leucocyte inhibitory factor
by concanavalin A- stimulated human lymphocytes (LIF_{ConA})

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 114, 4 (1975) 1161-1165

ROCKLIN, R.E. :

Mediators of cellular immunity

aus BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY

ed. by FUDENBERG, H.H., STITES, D.P., WELLS, J.V. :

Lange medical publications, Los Altos, Calif. (1978) 128-138

ROTH, J.A., KAEBERLE, M.L. :

Evaluation of bovine polymorphonuclear leucocyte function

VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY 2(1981)157-174

ROZING, J., VAESSEN, L.M.B. :

Mitogen responsiveness in rats

TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 11, 3 (1979) 1667-1669

RUSCETTI, S.K., GILL III, T.J., SALVIN, S.B., HERRMAN, J., BAILIE, C.W.:

Production of migration inhibitory factor in inbred rats

INT. ARCHS. ALLERGY APPL. IMMUN. 52 (1976) 417-421

SALVIN, S.B., NISHIO, J. :

"In vitro" cell reactions in delayed hypersensitivity
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 103 (1969) 138-141

SALVIN, S.B., YOUNGNER, J.S., LEDERER, W.H. :

Migration inhibitory factor and interferon in the circulation
of mice with delayed hypersensitivity
INFECTION AND IMMUNITY 7, 1 (1973) 68-75

SCHLAACK, M.:

Zur Standardisierung und diagnostischen Bedeutung der phyto-
mitogen-induzierten Lymphozytentransformation
IMMUNITÄT UND INFEKTION 3, 3 (1975) 136-142

SCHMID, D.O., CWIK, S. :

Über den Nachweis von Phaseolus-vulgaris-Rezeptoren
bei Lymphozyten und Granulozyten von Rind und Schwein
ZBL. VET. MED. B , 20 (1973) 169-172

SCHMID, D.O., CWIK, S. :

Concanavalin A receptors on blood cells of sheep, goat and pig
JOURNAL OF IMMUNOGENETICS 1 (1974) 429-431

SEYFARTH, M., KÖHLER, H. :

Makrophagen-Migrations-Hemmungs-Test
aus IMMUNOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN
ed. by FRIEMEL, H. (1980) 543-547

SLOMAN, J.C., BELL, P.A. :

Cell cycle-specific effects of glucocorticoids on phytohaemagglutinin
stimulated lymphocytes
CLIN. EXP. IMMUNOL. 39 (1980) 503-509

SMITH, K.A., LACHMAN, L.B., OPPENHEIM, J.J., FATAVA, M.F.:

The functional relationship of interleukins
J. EXP. MED. 151 (1980) 1551-1556

SMITH, W.G., USINGER, W.R., SPLITTER, G.A.:

Bovine ConA-induced suppressor cells: generation, macrophage
requirements and possible mechanisms of regulatory action
IMMUNOLOGY 43 (1981) 91-100

SOBORG, M., BENDIXEN, G. :

Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity

ACTA MEDICA SCANDINAVIA 181, 2 (1967) 247-255

STOBO, J.D., PAUL, W.E. :

Functional heterogeneity of murine lymphoid cells

II. Acquisition of mitogen responsiveness and of θ -antigen during the ontogeny of thymocytes and "T" lymphocytes

CELLULAR IMMUNOLOGY 4 (1972) 367-380

SZIGETI, R., MASUCCI, M.G., MASUCCI, G., KLEIN, E., KLEIN, G.,
BERTHOLD, W.:

Interferon suppresses antigen- and mitogen-induced leucocyte-migration inhibition

NATURE 288 (1980) 594-596

TIMMS, L.M. :

Correlation of the lymphocyte transformation, leucocyte migration inhibition and the delayed cutaneous hypersensitivity tests in chickens sensitised to Mycobacterium tuberculosis

RES. VET. SCI. 27, 3 (1980) 347-353

VOLLMERHAUS, B., BOLLWAHN, W., ROOS, H., HEINRITZI, K., WAIBL, H. :

Vereinfachte Methode zur Blutentnahme beim Ferkel

Prakt. Tierarzt 63 (1982) 538-541

WAKSMAN, B.H., NAMBA, Y. :

Commentary

On soluble mediators of immunologic regulation

CELLULAR IMMUNOLOGY 21 (1976) 161-176

WATANUKI, M., HAGA, S. :

The statistical distribution of macrophage migration distance and its application to the MIF test

JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 15 (1977) 331-341

WECKER, E., SCHIMPL, A. :

Mediatorstoffe als Kommunikationsmittel von Lymphozyten bei der Immunreaktion

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT 57 (1979) 631-640

WEESE, J.L., McCOY, J.L., DEAN, J.H., ORTALDO, J.R., BURK, K.R.

HERBERMAN, R.B. :

Brief communication: technical modifications of the human agarose microdroplet leucocyte migration inhibition assay

JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 24 (1978) 363-370

WILLIAMS, R.M., BENACERRAF, B. :

Comparison of T lymphocyte-dependent and B lymphocyte-dependent mitogen-stimulated DNA synthesis in serum-free medium with spleen cells from animals chosen for broad variation in genetically determined differences in T lymphocyte mitogen responsiveness

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 113, 6 (1974) 1844-1849

YOSHIDA, T., COHEN, S. :

Lymphokine activity in vivo in relation to circulating monocyte levels and delayed skin reactivity

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 112, 4 (1974) 1540-1547

Herrn Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung in München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. O. Schmid für die Überlassung des interessanten Themas und für seine jederzeit gewährte großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. S. Cwik für seine liebenswürdige Hilfsbereitschaft und seine vielen wertvollen Anregungen.

Für die blutgruppenserologischen Untersuchungen bedanke ich mich bei Herrn Tierarzt L. Erhard.

Allen Mitarbeitern des Blutgruppeninstituts, besonders Frau Dietrich, danke ich für die freundliche Aufnahme und die technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Kräußlich und Herrn Prof. Dr. J. Meyer gilt mein Dank für die zur Verfügung gestellten Tiere des Lehr- und Versuchsgutes München - Oberschleißheim.

Für die hilfreiche Unterstützung bei den Blutentnahmen danke ich Herrn H. Schmid.

LEBENS LAUF

- 1952 am 14. Januar wurde ich als Tochter des Kaufmanns Helmut Sallinger und seiner Ehefrau Luzia geb. Bächle, in Rastatt/ Bd. geboren
- 1958 - 1962 Besuch der Volksschule in Rastatt
- 1962 Eintritt in das Ludwig-Wilhelm-Gymnasium Rastatt
- 1970 Abitur
- 1970 - 1972 Ausbildung zur biologisch-technischen Assistentin in Landau/ Pf.
- 1972/73 Anstellung als BTA an der Pädagogischen Hochschule in Karlsruhe
- 1973 Immatrikulation an der Universität Mainz, im Chemie, danach Fachwechsel zu Biologie, Diplom.
- 1977 Vordiplomprüfung Biologie
- 1977/78 Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Fach Tiermedizin
- 1982 Staatsexamen Tiermedizin und Approbation als Tierärztin
- seit 1982 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Blutgruppeninstitut der Fakultät.

